

# **A HUMÁN SZÉRUM $\alpha$ 1-SAVANYÚ GLIKOPROTEIN OLIGOSZACHARID-SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés

Molnárné Szöllősi Éva

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia doktori program

Programvezető: Dr. Horváth István Tamás

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Szerves Kémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Dibó Gábor

egyetemi docens, a kémiai tudományok kandidátusa

Országos Onkológiai Intézet, Biokémiai Osztály

Konzulens: Prof. Dr. Kremmer Tibor

tudományos tanácsadó, a kémiai tudományok doktora

Budapest, 2007

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	5
1 BEVEZETÉS .....	7
2 CÉLKITŰZÉS .....	9
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	11
3.1 AZ $\alpha$ 1- SAVANYÚ GLIKOPROTEIN SZERKEZETE ÉS ÉLETTANI JELENTŐSÉGE .....	11
3.1.1 Az AGP tulajdonságai .....	11
3.1.2 Az AGP szerkezete .....	11
3.1.3 A szerkezet és élettani funkció kapcsolata .....	15
3.2 AZ AGP KINYERÉSE HUMÁN SZÉRUMBÓL .....	15
3.2.1 Preparatív módszerek .....	15
3.2.2 Affinitáskromatográfiás módszerek .....	16
3.3 AZ AGP SZÉNHIDRÁTSZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATA .....	17
3.3.1 Sziálsav-analízis .....	17
3.3.2 Oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analízise .....	19
3.3.2.1 Glikoproteinek hidrolízise glikozidáz enzimmel .....	19
3.3.2.2 Oligoszacharidok anioncserélő folyadékkromatográfiás meghatározása .....	20
3.3.2.3 Oligoszacharidok meghatározása származékképzést követően .....	20
3.3.2.4 Oligoszacharidok HPLC-MS vizsgálata .....	22
3.3.3 Az oligoszacharidok tömegspektrometriás vizsgálata .....	22
3.3.3.1 A mintaelőkészítés szerepe az oligoszacharidok tömegspektrometriás vizsgálatában .....	23
3.3.4 Glikopeptidek folyadékkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálata .....	24
3.3.4.1 A glikoproteinek proteolitikus emésztése .....	24
3.3.4.2 A glikopeptidek mintaelőkészítési módszerei .....	24
3.3.4.3 Glikopeptidek folyadékkromatográfiás és HPLC-MS vizsgálata .....	24
3.3.4.4 Néhány példa az AGP glikopeptidek vizsgálatára .....	25
4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	26
4.1 AZ AGP IZOLÁLÁSA ÉS TISZTÍTÁSA HUMÁN SZÉRUMBÓL .....	26
4.1.1 Anyagok .....	26

4.1.2	Mintavétel.....	26
4.1.3	Humán szérum AGP kinyerése folyadék/folyadék fázisú extrakcióval .....	26
4.1.4	Kicsapás etanollal.....	27
4.1.5	Az AGP elválasztása ioncserélő kromatográfiával.....	27
4.1.6	Sómentesítés gélkromatográfiával.....	28
4.1.7	Az AGP tisztítása festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiával. 28	
4.1.8	Tisztaságvizsgálat gélelektroforézissel.....	29
4.1.9	Az AGP azonosítása és tisztaságának vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával .....	29
4.1.10	Az AGP mennyiségének meghatározása UV spektrofotometriával .....	29
4.2	AZ AGP ANALÍZISE ÉS SZERKEZETVIZSGÁLATA .....	30
4.2.1	Anyagok.....	30
4.2.2	Humán szérum AGP szíalsavtartalmának meghatározása.....	30
4.2.3	Humán szérum AGP emésztése PNG-áz F enzimmel.....	31
4.2.4	Oligoszacharidok normál fázisú HPLC analízise .....	32
4.2.5	Oligoszacharid-származékok előállítása MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára.....	33
4.2.6	Humán szérum AGP emésztése tripszinnel.....	33
4.2.7	A tripszines emésztési termék RP-HPLC (mikropreparatív) elválasztása.....	34
4.2.8	A tripszines emésztési termék on-line HPLC- MS vizsgálata .....	35
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	36
5.1	A HUMÁN SZÉRUM AGP IZOLÁLÁSA ÉS TISZTÍTÁSA .....	36
5.1.1	A humán szérum AGP-tartalmának kinyerése folyadék/folyadék fázisú extrakcióval .....	37
5.1.2	Kicsapás etanollal.....	37
5.1.3	Az AGP elválasztása ioncserélő kromatográfiával.....	37
5.1.4	Sómentesítés gélkromatográfiával.....	38
5.1.5	Az AGP tisztítása festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiával. 39	
5.2	AZONOSÍTÁS ÉS TISZTASÁGVIZSGÁLAT .....	40
5.2.1	SDS-PAGE gélelektroforézis .....	40
5.2.2	Azonosítás és tisztaságvizsgálat MALDI-TOF tömegspektrometriával.....	40
5.3	AZ AGP ANALÍZISE ÉS SZERKEZETVIZSGÁLATA .....	41
5.3.1	Az AGP szíalsavtartalmának meghatározása .....	42
5.3.2	Az AGP emésztése PNG-áz F enzimmel.....	43
5.3.3	Oligoszacharidok normál fázisú HPLC analízise .....	43

5.3.4	Az oligoszacharid-frakciók azonosítása .....	45
5.3.5	Oligoszacharid standardok NP-HPLC vizsgálata .....	47
5.3.6	Egyedi AGP oligoszacharid minták HPLC analízise .....	48
5.3.7	Oligoszacharid-származékok előállítása MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára .....	54
5.3.8	Az AGP emésztése tripszinnel.....	55
5.3.9	A tripszines emésztési termék RP-HPLC vizsgálata .....	56
5.3.10	A tripszines emésztési termék oligoszacharid-tartalmának vizsgálata .....	57
5.3.11	Az AGP tripszines hidrolizátumának on-line HPLC-MS vizsgálata .....	58
5.4	AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA .....	59
6	ÖSSZEFOGLALÁS .....	60
7	IRODALOMJEGYZÉK .....	63
	KÖZLEMÉNYEK.....	73
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	77
	RÖVID ÖSSZEFOGLALÓ .....	78
	SUMMARY .....	79

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>A1</b>	Egy szíalsavval rendelkező komplex típusú biantennáris oligoszacharid
<b>A2</b>	Komplex típusú biantennáris oligoszacharid
<b>A2F</b>	Fukóztartalmú komplex típusú biantennáris oligoszacharid
<b>A3</b>	Komplex típusú triantennáris oligoszacharid
<b>AA</b>	Antranilsav
<b>AA-AC</b>	3-acetamido-6-amino-akridin
<b>AAG</b>	$\alpha$ 1- acid glycoprotein; $\alpha$ 1- savanyú glikoprotein
<b>2-AB</b>	2-aminobenzamid
<b>ABEE</b>	<i>p</i> -amino-benzoészav-etilészter
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AGP</b>	$\alpha$ 1- acid glycoprotein; $\alpha$ 1- savanyú glikoprotein
<b>2-AMAC</b>	2-aminoakridon
<b>ANTS</b>	8-aminonafthalin-1,3,6-triszulfonsav
<b>2-AP</b>	2-aminopiridin
<b>3-APP</b>	2-amino-3-fenilpirazin
<b>APS</b>	Ammónium-perszulfát
<b>APTS</b>	1-aminopirén-3,6,8-triszulfonát
<b>BHT</b>	3,5-di- <i>terc</i> -4-butilhidrox-toluol
<b>CM</b>	Karboximetil
<b>Con A</b>	Concanavalin A (lektin)
<b>Da</b>	Dalton
<b>DEAE</b>	Dietil-aminoetil
<b>DHB</b>	2,5-dihidrox-benzoészav
<b>DMB</b>	1,2-diamino-4,5-metiléndioxi-benzol
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Etilén-diamin-tetraecetsav
<b>ESI</b>	Elektrospray ionizáció
<b>FD</b>	Fluoreszcenciás detektálás
<b>FPLC</b>	Fast protein liquid chromatography; gyors fehérje folyadékkromatográfia
<b>FTICR-MS</b>	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy; Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrometria

<b>GE</b>	Gélelektroforézis
<b>HPAEC-PAD</b>	High pH anion exchange chromatography – pulsed amperometry detection; Magas pH-jú anioncserélő kromatográfia pulzáló amperometriás detektálással
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography; nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<b>HPLC-MS</b>	High performance liquid chromatography – mass spectrometry; nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia tömegspektrometriás detektálással
<b>LIF</b>	Lézerindukált fluoreszcencia
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight; mátrixszal segített lézerdeszorpciós ionizáció repülési idő analizátorral
<b>MS</b>	Mass spectrometry; tömegspektrometria
<b>m/z</b>	Tömeg/töltés
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance (spectroscopy); mágneses magrezonancia (spektroszkópia)
<b>NP-HPLC</b>	Normal phase high performance liquid chromatography; normál fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<b>ORM</b>	Orozomukoid
<b>PCA</b>	Pyrrolidone carboxylic acid; pirrolidon-karbonsav
<b>PDA</b>	Piperazin-diakrilamid
<b>PNG-áz F</b>	Protein N-glikozidáz F enzim
<b>RP-HPLC</b>	Reversed phase high performance liquid chromatography; fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<b>SD</b>	Standard deviáció
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis; nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
<b>TCA</b>	Triklór-ecetsav
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilén-diamin
<b>TFA</b>	Trifluorecetsav
<b>THAP</b>	2,4,6-trihidroxi-acetofenon
<b>TPCK</b>	<i>N-p</i> -tozil-L-fenilalanin-klórmetil-ke-ton
<b>TRIS</b>	Trisz-hidroximetil-aminometán
<b>UV</b>	Ultraviolet; ultraibolya

# 1 BEVEZETÉS

A természetes vegyületek vizsgálatának napjainkban kitüntetett szerepe van. Az élő szervezetben található anyagok tanulmányozásával számos új információ nyerhető az élettani folyamatok kutatásában. Az eredményeket többek között olyan alkalmazási területeken használhatjuk föl, mint az új fehérjék, enzimek felfedezése, betegségek hatásmechanizmusának felderítése, gyógyszerkutatási, toxikológiai alkalmazások, vagy az orvosi diagnosztika.

A biológiaiilag aktív vegyületek részletesebb megismerését az analitikai (GC, HPLC, radiometriai, elektrokémiai) és szerkezetvizsgálati (UV, CD, NMR, tömegspektrometriai, röntgendiffrakciós) módszerek utóbbi évtizedekben tapasztalható rohamos fejlődése tette lehetővé, ami nagymértékben hozzájárult a kis és nagy molekulatömegű természetes vegyületek kémiai összetételének, térszerkezetének és biológiai funkciójának tisztázásához.

A biológiai objektumok és környezetük, a biológiai mátrix az esetek túlnyomó részében komplex rendszert alkotnak. Általában a vizsgált anyag maga is heterogén szerkezetű, ami szelektív és biokompatibilis mintaelőkészítési módszerek, valamint minőségi és mennyiségi meghatározásokra alkalmas eljárások kidolgozását tette szükségessé. Nagy jelentőséggel bír az egyes biomolekulák, ún. diagnosztikai markerek mennyiségének analitikai módszerekkel, tesztekkel való követése a megbetegedések lefolyásában.

A legtöbb fehérje a poszttranszlációs módosítások következtében kisebb vagy nagyobb mértékben szénhidrát egységeket tartalmaz [1]. A glikokonjugátumok számos olyan élettani folyamatban vesznek részt, mint például az anyagcsere- és transzportfolyamatok, a sejtek közötti kommunikáció és az immunológiai jelenségek [2].

Az akut fázis fehérjék a humán szérum összetevőinek olyan csoportját alkotják, amelyek többségben glikoproteinek és koncentrációjuk olyan patofiziológias folyamatok során, mint a gyulladások, hormonváltozások és a daganatos megbetegedések, többszörös mértékben változhat. Ezen belül az utóbbi évtizedekben megnőtt az érdeklődés a szialoglikoproteinek (mukoproteinek) tanulmányozása iránt. Ezeknek a bioaktív vegyületeknek a szénhidráttartalmát elsősorban neutrális

monoszacharidok, hexózaminok és szíálsav alkotják. Az újabb vizsgálatok arra utalnak, hogy a szialoglikoproteinek oligoszacharid-szerkezetében bekövetkező minőségi változások, a szénhidrát összetevők arányának, a glikánláncok hosszának és elágazásának, ún. mikroheterogenitásának a változása összefüggésbe hozható a különböző fiziológias és/vagy kóros folyamatokkal. A fehérje glikoziláció tanulmányozása a nagyfokú heterogenitás miatt nem könnyű feladat a bioanalitikusok számára. Gyakran több vizsgálati módszerre, valamint kémiai és enzimatisus módosítások egész sorára van szükség a glikánok szerkezetének teljes feltérképezéséhez.

Doktori munkám során korszerű analitikai és preparatív bioszeparációs eljárások alkalmazásával kívántam kimutatni azokat a változásokat, amelyek egyes daganatos megbetegedések (ovárium, limfómák) hatására egy akut fázis fehérje, a humán szérum  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) glikánszerkezetében következnek be. Ezeknek a különbségeknek a kimutatása egy új tumormarker fejlesztésének lehetőségét hordozza magában.



## 2 CÉLKITŰZÉS

Az oligoszacharidok és származékaik fontos szerepet töltenek be a természetes glikokonjugátumok (glikolipidek, glikoproteinek) szerkezetében és élettani funkcióiban. Napjainkban a glikoproteinek szénhidrát szerkezetének vizsgálata a proteomika (glikobiológia) igen fontos kutatási területe, amely a biomolekulákban megfigyelhető mikroheterogenitások és a biológiai funkció közötti összefüggéseket vizsgálja. A humán szérumban  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) frakciója jelentős mennyiségben tartalmaz elágazó láncú, ún. antennáris szerkezetű oligoszacharidokat. Vizsgálataim célja az AGP oligoszacharid-szerkezetében bekövetkező változások kimutatása volt daganatos megbetegedések esetén.

1. Munkám során olyan biokompatibilis mintaelőkészítési eljárások kidolgozását és/vagy alkalmazását tűztem ki célul, amelyekkel a humán szérumból az analitikai és szerkezetvizsgálati módszerek céljára szennyezésektől mentes, intakt AGP minták állíthatók elő.
2. A humán szérumban AGP minták szíálsav összetételét savas hidrolízissel és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel kívántam meghatározni. Az analízis eredményeiből arra kívántam következtetni, hogy az oligoszacharidok láncvégi szíálsavtartalmában tapasztalhatók-e a daganatos megbetegedésekre jellemző mennyiségi változások.
3. Célul tűztem ki az AGP glikántartalmának protein N-glikozidáz F (PNG-áz F) enzimmel történő lehasítását és kinyerését. Az oligoszacharidok tisztítására olyan kíméletes és szelektív mintaelőkészítési módszer kidolgozását, illetve alkalmazását terveztem, amellyel a folyadékkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálatok számára nagytisztaságú minták állíthatók elő.
4. Az AGP-ből kinyert glikánok szerkezetét és azok arányát HPLC módszerrel kívántam meghatározni. Az oligoszacharidok származékképzésével olyan érzékeny és szelektív analitikai módszert kívántam alkalmazni, amely során információt kapunk a különböző elágazásszámú antennáris szerkezetek minőségéről és azok arányairól az egészséges és kóros mintákban.

5. Nagyszámú egyedi oligoszacharid mintát kívántam előállítani egészséges, ovárium tumoros és limfómás egyének szérumban AGP frakciójából tömegspektrometriás vizsgálatok számára. Az érzékenység növelése céljából származékot kívántam képezni a PNG-áz F enzim hasítással kapott glikánokból, valamint kíméletes mintaelőkészítési módszert kívántam alkalmazni.
6. A glikánoknak a peptidlánchoz való kapcsolódási helye szerinti vizsgálatához célul tűztem ki a humán szérumban AGP tripszines emésztését és a keletkező peptidek, glikopeptidek fordított fázisú HPLC elválasztását. Ennek során olyan módszert kívántam alkalmazni, amely lehetővé teszi az oligoszacharid tartalmú glikopeptidek azonosítását. Kísérleteim célja a tripszines hidrolizátum HPLC-MS vizsgálata kidolgozásának támogatása volt.

## 3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 3.1 Az $\alpha$ 1- savanyú glikoprotein szerkezete és élettani jelentősége

#### 3.1.1 Az AGP tulajdonságai

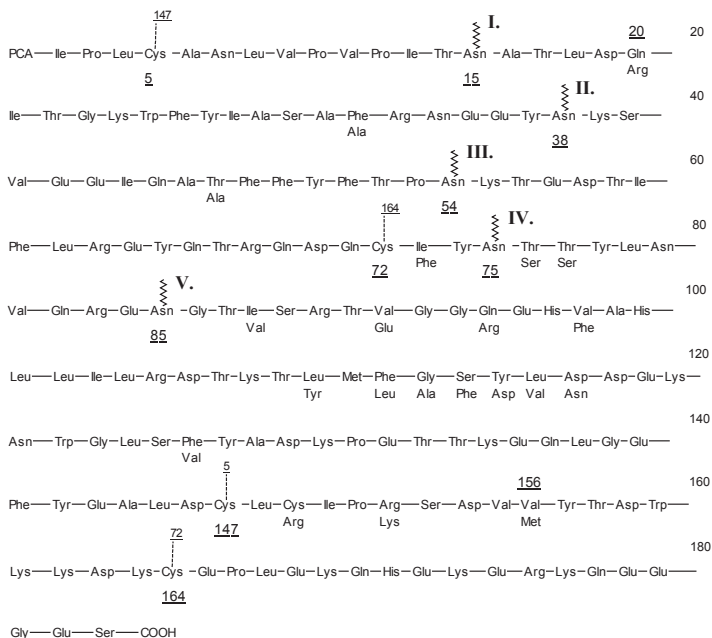
Az  $\alpha$ 1- savanyú glikoprotein (AGP, AAG) vagy orozomukoid (ORM) a májsejtek által termelt akut fázis fehérjék családjába tartozik, amelyek szérum koncentrációja fizikai traumák, sérülések, bakteriális fertőzések, vagy gyulladások esetén fokozódik. Az AGP 0,2–1,0 mg/ml koncentrációban fordul elő az egészséges emberek szérumában, ám különböző betegségek, sérülések esetén ez többszörösére is emelkedhet [3-9]. Bár számos publikáció foglalkozik biológiai funkciójával, szerepe még nem pontosan tisztázott. Részt vesz a különböző immunmodulációs folyamatokban, valamint fizikokémiai tulajdonságainak köszönhetően a bázikus gyógyszerek és szteroid hormonok megkötésében. Ezen tulajdonsága miatt a lipokalinok családján belül az immunokalinok csoportjához sorolják [10].

Az AGP-t Schmid [11] és Winzler [12] izolálta 1950-ben, amely sokáig a legmagasabb szénhidráttartalmú glikoproteinként volt ismeretes. A humán szérum  $\alpha$ 1-globulin frakciójához tartozó 41–43 kDa molekulatömegű AGP egyedülálló tulajdonságai miatt emelkedik ki a többi plazmafehérje közül. Rendkívül magas, 45 tömeg % szénhidráttartalommal, a nagy mennyiségben hozzá kötődő szialsavnak köszönhetően pedig alacsony izoelektromos ponttal ( $pI \sim 2,8-3,8$ ) és kiváló vízdíszítósággal rendelkezik [3].

#### 3.1.2 Az AGP szerkezete

A humán AGP aminosavsorrendje az 1. ábrán látható. A polipeptidláncot 183 aminosav alkotja. N-terminálisán pirrolidon-karbonsav egység (PCA), C-terminálisán pedig szerin helyezkedik el. A szekvencia megtalálható a SwissProt adatbázisában (<http://ca.expasy.org/uniprot/P02763>). Két genetikai variánsa között (ORM1 és ORM2) 22 aminosavnyi különbség fedezhető fel [3], és további két helyen (20-as és 156-os aminosav) a populációtól függő aminosavcsere mutatkozik meg (ORM1\*F1, \*F2 és \*S). Az AGP szerkezetét két diszulfid-híd stabilizálja

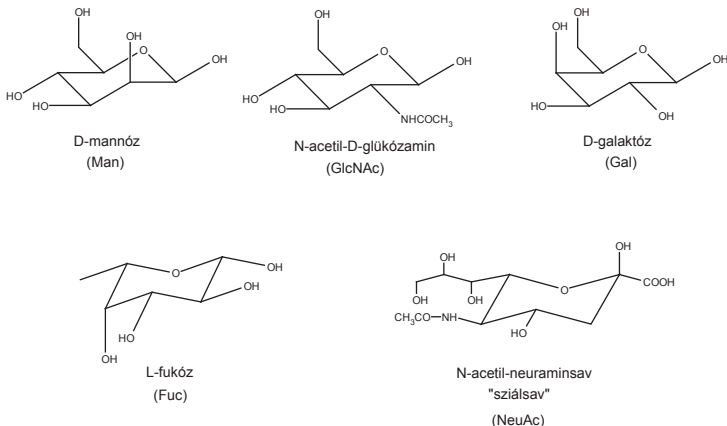
az 5-ös és 147-es, valamint a 72-es és 164-es ciszteinek között. Schmid szignifikáns homológiát állapított meg az AGP és az immunglobulinok szekvenciája között [13].



1. ábra A humán AGP aminosavsorrendje

Az AGP szénhidrátszerkezetét részletesebben kutatták, ugyanis ez egyike azon kevés glikoproteineknek, amely négy elágazást tartalmazó, ún. tetraantennáris oligoszacharidokat is tartalmaz a bi- és triantennáris szerkezetek mellett [14]. A komplex típusú glikánláncok a 15-ös (I.), 38-as (II.), 54-es (III.), 75-ös (IV.) és 85-ös (V.) helyzetben lévő aszparagin  $\beta$ -karboxil-csoportján keresztül *N*-glikozidos kötéssel kapcsolódnak a polipeptidlánchoz, amelyek az adott helyen sokféle kombinációban jelenhetnek meg. Az AGP oligoszacharid láncainak alkotórészei a 2. ábrán láthatók. A komplex típusú oligoszacharidok felépítésében az *N*-acetyl-D-glükózamin (GlcNAc), D-mannóz (Man) és D-galaktóz (Gal) vesznek részt, a láncok végein pedig (terminális) *N*-acetyl-neuraminsav (sziálsav, NeuAc) található, aminek

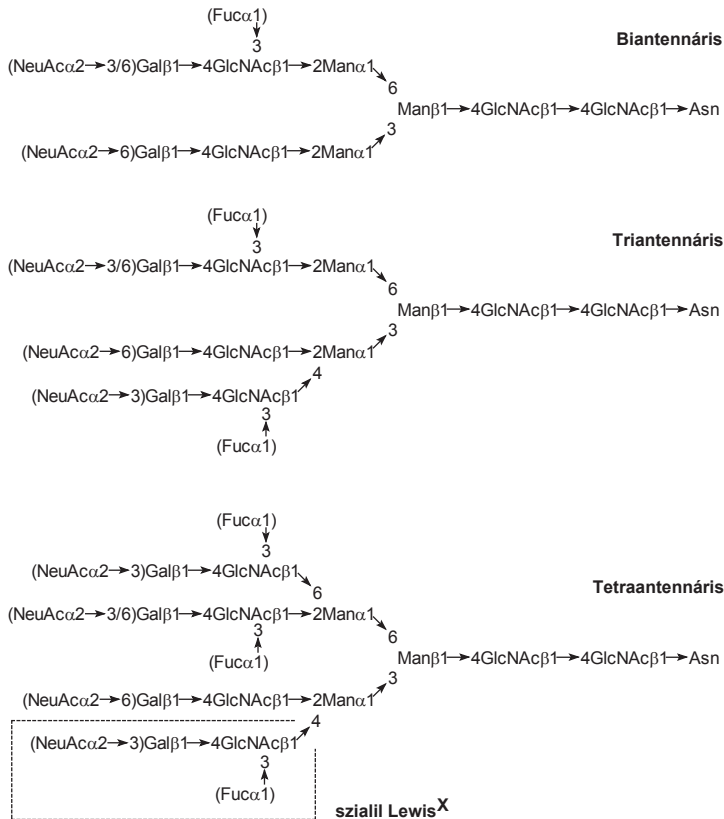
a glikoprotein savas tulajdonságát köszönheti. A glikánlánchoz további L-fukóz (Fuc) kapcsolódhat.



**2. ábra A humán AGP oligoszacharid láncok építőkövei**

A szénhidrát összetevők minősége és az elágazások száma nagy kombinációs lehetőségre és szerkezeti változatosságra ad lehetőséget, ami az AGP mikroheterogenitását eredményezi. Az AGP-ben előforduló jellegzetes glikánszerkezetek a 3. ábrán láthatók. Valójában az I. pozícióban nem fordul elő tetraantennáris szerkezet, a II. pozícióban nem találunk fukóztartalmat, a IV. pozíció nem hordoz biantennáris glikánt és csak a IV. és V. pozícióban találunk több fukózt tartalmazó tetraantennáris szerkezeteket. A humán szérum AGP-ben tehát összesen mintegy 30-40 ún. glikoforma valósul meg és a mikroheterogenitást a patofiziológias körülmények erősen befolyásolják. A glikánrész nagyfokú heterogenitása miatt az AGP röntgendiffrakciós analízise korlátokba ütközik, ezért térbeli szerkezete sem pontosan ismert.

Montreuil proton NMR vizsgálatai (1980) az oligoszacharidok peptidlánchoz való kapcsolódását és antennáris szerkezetét írta le [15]. Az oliszacharidok és glikopeptidek szerkezetvizsgálata a proton NMR mellett [16, 113] a röntgen kristallográfia és elméleti molekulamodellzési módszerekkel történt [17].



**3. ábra** Az AGP-ben található antennáris szerkezetű oligoszacharidok típusai

2004-ben Nagy az intakt AGP nagyfelbontású tömegspektrometriás vizsgálatát valósította meg elektrospray ionizáció — fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia (ESI/FT-ICR) módszerrel, amellyel lehetővé vált a fehérje mikroheterogenitásának a molekulaionból történő vizsgálata [18].

### 3.1.3 A szerkezet és élettani funkció kapcsolata

Egyedülálló tulajdonságai miatt, valamint a szérum fontos alkotórészeként gyakran tanulmányozzák az AGP-nek gyógyszerekkel való kölcsönhatását, ami farmakokinetikai és klinikai szempontból nagy jelentőségű [5, 19-21].

Duché és munkatársai az AGP genetikai variánsainak termelődésében és mikroheterogenitásában bekövetkező változásokat figyelték meg daganatos megbetegedések esetén [22-25]. A genetikai variánsok vizsgálatában általában immobilizált fémion [réz(II)-ion] affinitáskromatográfiás [23, 24, 26] és poliakrilamid gélben történő izoelektromos fókuszálási módszereket alkalmaztak [22, 25, 27].

Számos közlemény foglalkozik a humán AGP glikánszerkezetének, mikroheterogenitásának megváltozásával különböző fiziológiás állapotokban, betegségekből, mint például az akut és krónikus gyulladások [28, 29], reumás artritisz [30, 31], artériás ischaemia [32], diabétesz [33] vagy éppen terhesség esetén [34]. Az oligoszacharid NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc részlete, melyet szialil Lewis<sup>X</sup> antigénnek neveznek (3. ábrán jelölve), különösen gyakran alanya az élettani folyamatokat érintő diagnosztikai jellegű vizsgálatoknak [9, 35-39]. Ezek alapján általánosságban elmondható, hogy a gyulladásos folyamatok esetén növekszik az AGP oligoszacharidok fukozilációjának mértéke.

## 3.2 Az AGP kinyerése humán szérumból

### 3.2.1 Preparatív módszerek

A humán szérum AGP izolálásának első lépése a legtöbb esetben a plazma-fehérjéknek savas közegben történő kicsapása volt, amihez általában perklórsavat használtak (pH 5,0) [12]. Az AGP tisztítása a felülúszó ioncserélő kromatográfiás elválasztásával folytatódott (DEAE- és/vagy CM-cellulóz oszlopon), majd utolsó lépésként gélkromatográfiás módszerrel szabadultak meg a maradék szennyezőktől és az eluens összetevőitől [3, 40, 41].

Kremmer az AGP kinyerésére egy vizet, metanolt és kloroformot tartalmazó, nem elegyedő fázisú oldószeres extrakciós módszert dolgozott ki. Az emulziót

4 °C-on rázatva, majd centrifugálva a vizes-metanolos felülúszó további ioncserélő kromatográfiás tisztításával jutott a glikoprotein frakciójához [6].

Az AGP-nek a humán szérumból való kinyerését nemcsak oldat fázisban, kromatográfiás módszerek segítségével, hanem gélelektroforézis útján is megvalósíthatjuk [42, 43]. A módszer előnye egyszerűségében rejlik, mert az AGP-t egy lépésben választhatjuk el a szérum többi komponensétől. Ez a technika lehetővé teszi az AGP további részletes vizsgálata céljából in situ gélben történő enzim hidrolízisét is, jelentősen lerövidítve a mintaelőkészítés idejét.

### **3.2.2 Affinitáskromatográfiás módszerek**

Travis és Pannell fedezte fel egy festék, a Cibacron blue F3G-A-nak humán szérum albuminnal való specifikus kölcsönhatását, amelynek segítségével elkülönítették a többi szérum fehérjétől [44]. Ezt a jelenséget kihasználva a fehérje-frakcionálás első lépéseként a festék ligandum affinitáskromatográfiás előkészítést vezették be, amelyet a hordozón immobilizált Cibacron blue állófázissal valósítottak meg [41, 45]. Az elválasztás mechanizmusa az ioncserélő, a molekulaszúly szerinti gélészűrő, valamint hidrofób kölcsönhatások egyedülálló kombinációja. További előnyt jelentett, hogy az ionerősség és pH gradiens alkalmazásán alapuló eljárás során nem tapasztalták a fehérjék denaturációját. Azzimonti és munkatársai a Cibacron Blue festék ligandum affinitáskromatográfia olyan alkalmazását valósították meg, amelyben az AGP-t — a minták egy éjszakán át történő dialízisét követően — egy lépésben nyerték ki a szérumból, valamint a genetikai variánsok szétválását tapasztalták [46].

A glikoproteinek komplex fehérjekeverékekből való szelektív kinyerésére legújabban a lektin affinitási kromatográfiát alkalmazzák. A lektinek olyan fehérjék, amelyek a szénhidrátokkal specifikus kölcsönhatásba lépnek anélkül, hogy módosítanák azokat [47]. Ennek a tisztítási módszernek a segítségével egy lépésben juthatunk a kívánt glikoproteinhez vagy glikoprotein keverékekhez. Az AGP humán plazmából való tisztítására és frakcionálására széleskörűen alkalmazzák a concanavalin A (ConA) lektin affinitáskromatográfiát [31, 48-50]. Ez a lektin a komplex típusú biantennáris oligoszacharid láncokhoz specifikusan kötődik, ezért az AGP különböző glikoformáinak elválasztására is alkalmas [51].



A legújabb módszerek szerint az AGP-t specifikus antigén-antitest kölcsönhatás révén, anti-humán-AGP szérum felhasználásával, kromatográfiás módszerrel nyerik ki a szérumból [28].

### **3.3 Az AGP szénhidrátszerkezetének vizsgálata**

A glikoproteinek mikroheterogenitásának vizsgálatára kétféle stratégia létezik. Az egyik szerint közvetlenül a natív fehérje glikoformáit választják el, amelyet concanavalin A lektin affinitáskromatográfiás [50, 52, 53], vagy modernebb változatával, az affinitás immunoelektroforézis módszerrel [9, 29, 32, 34, 39, 54], vagy kapilláris elektroforézissel [55] valósítanak meg.

A másik stratégia szerint az AGP-ben előforduló oligoszacharid-szerkezeteket kémiai vagy enzimatis hasítást követően kromatográfiás és/vagy tömegspektrometriás módszerrel határozzák meg. Ezeket a vizsgálatokat a hexózok/hexózaminok szekvenálása és a láncvégi szíálsav mennyiségi analízise egészíti ki. A glikánszerkezet vizsgálata a polipeptidlánchoz való kapcsolódási pont szerinti („glycosylation site”) analízist is magában foglalja. A proteomikában használatos analitikai technikák fejlődése (pl. tandem tömegspektrometriával kapcsolt kapilláris HPLC módszer) lehetővé tette a fehérjéhez való kapcsolódási pozíciók és a hozzájuk kötődő glikánok azonosítását az enzimatis úton előállított glikopeptidek analízisével [56].

#### **3.3.1 Szíálsav-analízis**

A szíálsav a glikoproteinek és glikolipidek oligoszacharid láncvégein található karbonsav funkciójú szénhidrát (2. ábra) [57]. A funkciós csoportok változatosságából adódóan több, mint 40-féle változatát találták meg az élő szervezetben [58]. Biológiai szerepük szerteágazó. Részt vesznek a pozitív töltésű molekulák megkötésében és transzportjában, valamint a molekulák és sejtek közötti felismerésben, kötődésben, vagy éppen álcázásukban, védelmet nyújt a glikoproteinek számára a proteázokkal szemben és stabilizálja a glikoproteinek konformációját [57]. A humán AGP-ben az *N*-acetyl-neuraminsav épül be a glikánláncok végére.

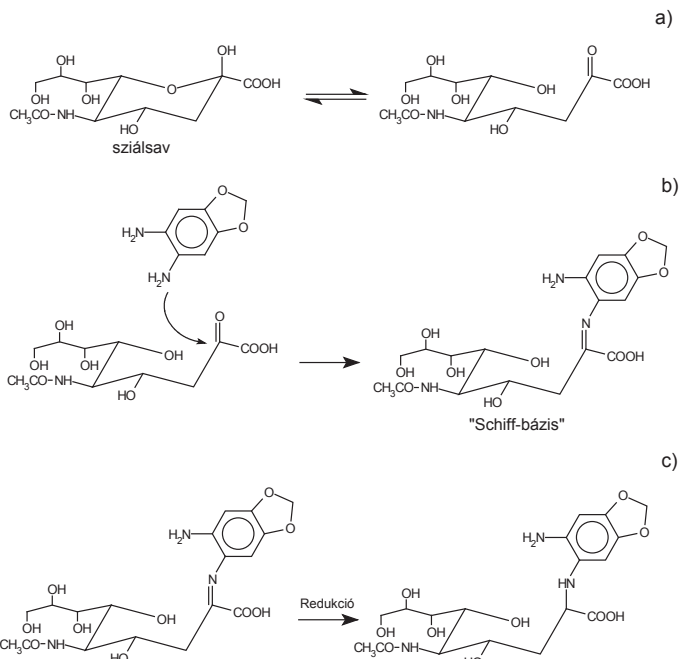
Az analízishez a láncvégi szíálsav lehasítása savas hidrolízissel (25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 80 °C, 1-24 óra) vagy enzimatis úton, neuraminidáz enzimmel történhet. Korábban a szíálsav meghatározására kolorimetriás (tiobarbitursav, rezorcinol) módszereket alkalmaztak, de ezek érzékenysége és specifikussága nem volt kielégítő [59, 60].

A szíálsav kvantitatív meghatározásának másik, manapság gyakran alkalmazott módszere a fluoreszcenciás detektálással kapcsolt HPLC. Az analízist a mintának fluoreszcens vegyülettel való származékképzése előzi meg. A leghatékonyabb származékképzőszernak az 1,2-diamino-4,5-metiléndioxibenzol (DMB) bizonyult, ami az  $\alpha$ -ketosavakkal történő specifikus reakciójának és a származékok nagy fluoreszcenciás intenzitásának köszönhető [61, 62]. A szíálsav DMB-származéka nanogram nagyságrendben mutatható ki a fluoreszcenciás HPLC módszerrel.

A származékképzés az ún. redukzív aminálás háromlépéses reakciójában történik, amely a 4. ábrán látható. Első lépésben felnyílik a szíálsav laktolgyűrűje (a). Ezután a származékképző szer amino-csoportja a glikán karbonil szénatomjához kapcsolódik és azzal Schiff-bázist képez (b). Harmadik lépésben pedig az imin-csoport redukciójával egy kb. 72 órán át stabil glikánszármazék képződik (c). Az analízis fordított fázisú (RP) HPLC oszlopon, izokratikus körülmények között történik.

A szíálsav meghatározására számos egyéb, UV-aktív és fluoreszcens anyaggal történő derivatizálást is alkalmaznak, a származékokat pedig HPLC, vagy kapilláris elektroforézis módszerrel vizsgálják [63, 64].

A szíálsav biológiai szerepét számos közlemény tárgyalja. Gyulladásos és daganatos megbetegedések esetén az akut fázis fehérjék és ezzel együtt a szíálsav szérum koncentrációjának emelkedését tapasztalták [42]. A szérum szíálsav meghatározása nem specifikus, így diagnosztikus markerként való alkalmazása óvatossággal kezelendő.



4. ábra A sziálsav származékképzése redukzív aminálással  
a) gyűrűfelnyílás b) Schiff-bázis képződése c) redukció

### 3.3.2 Oligoszacharidok folyadékkromatográfiás analízise

A glikoproteinek oligoszacharid-tartalmát kémiai vagy enzimatisus úton hasítják le a polipeptidlánchról, szerkezetüket pedig folyadékkromatográfiás és/vagy tömegspektrometriás módszerekkel vizsgálják. A folyadékkromatográfiás módszerek többsége a monoszacharidok analízisében is alkalmazható. A kémiai hidrolízis vízmentes hidrazinnal történik [66], amelyben az oligoszacharidok hidrazon-származéka képződik.

#### 3.3.2.1 Glikoproteinek hidrolízise glikozidáz enzimmel

A kíméletesebb enzimatisus hidrolízist a fehérje denaturálását követően protein N-glikozidáz F (PNG-áz F) enzimmel hajtják végre, amelynek hasítási termékei a glikozilaminok, a peptidláncban pedig aszparaginsav marad vissza a kapcsolódási

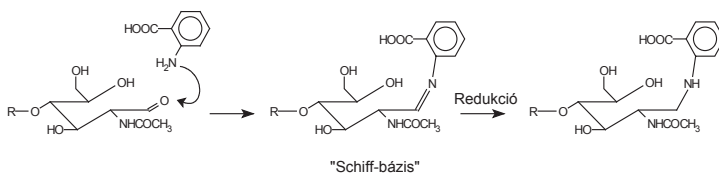
helynél. Bizonyos esetekben a láncvégi szíalsavat is eltávolítják neuraminidáz enzimmel.

### 3.3.2.2 Oligoszacharidok anioncserélő folyadékkromatográfiás meghatározása

Az oligoszacharid-keverék HPLC analizésére többféle módszer létezik. A pulzáló amperometriás detektálással kapcsolt magas pH-jú anioncserélő kromatográfia (high pH anion exchange chromatography — pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD) esetén a glikánokat származékképzés nélkül, közvetlenül analizálják. Eluensként 0,1–0,3 M NaOH-ot és Na-acetátot alkalmaznak. Ilyen körülmények között a glikánok hidroxilcsoportjai disszociálnak és a szénhidrát-oxianionok kölcsönhatásba lépnek az ioncserélő oszloppal [67, 68]. Az oligoszacharid frakciók off-line vagy on-line tömegspektrometriás vizsgálatához a minta neutralizálására, vagy sómentesítésére van szükség, amit gélkromatográfiás, vagy ioncserélő mikromembránok alkalmazásával valósítanak meg [67, 69, 89, 91].

### 3.3.2.3 Oligoszacharidok meghatározása származékképzést követően


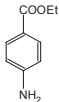


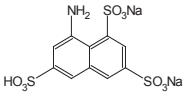
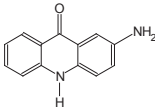
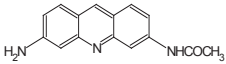
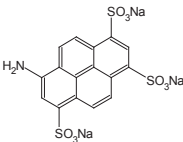

Még érzékenyebb és szelektívebb detektálást tesz lehetővé az oligoszacharidoknak UV-aktív, vagy fluoreszcens anyaggal történő származékképzése. Így azok a glikoproteinek is vizsgálhatók, amelyek korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre. A származékképzés a szíalsav esetében már ismertetett redukatív aminálással történik. Az oligoszacharidoknak 2-aminobenzoesavval (antranilsavval) történő származékképzése az 5. ábrán látható.



5. ábra Oligoszacharidok származékképzése antranilsavval

A leggyakrabban alkalmazott származékképző szereket az 1. táblázatban foglaltam össze. A szénhidrát-származékok vizsgálata elektroforetikus [72, 73], normál fázisú (NP) anioncserélő (amin-) oszlopon [74, 75], vagy fordított fázisú (RP) oszlopon [76, 77], UV-, fluoreszcenciás vagy tömegspektrometriás detektálással, vagy ezek kombinálásával, HPLC módszerrel történik [30, 78, 79].

1. táblázat Az oligoszacharidok meghatározásában leggyakrabban alkalmazott származékképző szerek

Származékképző szer	Képlet	Módszer	Ref.
<b>2-AP</b> 2-aminopiridin		NP-HPLC-UV RP-HPLC-UV RP-HPLC-MS	[80] [30]
<b>ABEE</b> <i>p</i> -amino-benzoészav- etilészter		NP-HPLC-UV HPLC-MS	[81]
<b>2-AB</b> 2-aminobenzamid		NP-HPLC-FD RP-HPLC-FD HPAEC-FD HPLC-FD HPLC-MS	[77] [66] [78] [79]
<b>AA</b> 2-aminobenzoesav (antranilsav)		NP-HPAEC-FD RP-HPLC-FD	[74] [75]
<b>ANTS</b> 8-aminonaftalin- 1,3,6-triszulfonsav		GE-FD	[72]
<b>2-AMAC</b> 2-aminoakridon		GE-FD	[82]
<b>AA-AC</b> 3-acetamido-6-amino- akridin		2-D GE MALDI	[83]
<b>APTS</b> 1-aminopirén- 3,6,8-triszulfonát		CGE-LIF	[84]
<b>3-APP</b> 2-amino-3-fenilpirazin		CE-LIF	[73]

Rövidítések: NP: normál fázisú, RP: fordított fázisú, HPAEC: magas pH-jú anioncserélő kromatográfia, FD: fluoreszcenciás detektálás, GE: gélelektroforézis, CGE: kapilláris gélelektroforézis, LIF: lézer indukált fluoreszcencia

Anumula és munkatársai a humán AGP oligoszacharidok antranilsav-származékainak HPLC analízisével nagyobb felbontást értek el, mint a HPAEC-PAD módszerrel. Eredményeikben a glikánok csúcsai szíalsavtartalmuk szerint csoportokat alkotva váltak szét [74].

#### **3.3.2.4 Oligoszacharidok HPLC-MS vizsgálata**

Viszonylag újkéletű az oligoszacharidok HPLC-MS vizsgálata. A glikánokat normál, vagy fordított fázisú oszlopon választják el és elektropray ionforrású tömegspektrométerrel detektálják [70, 85-87].

Az oligoszacharid láncok szekvenálásával, amelyet glikozidáz ( $\alpha$ -fukozidáz,  $\beta$ -galaktózidáz,  $\alpha$ -mannozidáz,  $\beta$ -N-acetilhexozaminidáz) enzimekkel valósítanak meg, további információ nyerhető az összetevők kapcsolódási sorrendjéről [74, 75, 78].

#### **3.3.3 Az oligoszacharidok tömegspektrometriás vizsgálata**

A tömegspektrometriás technikák nagy szerepet játszanak a glikoproteinek oligoszacharid-szerkezetében, az élettani folyamatok hatására bekövetkező változások megfigyelésében. Az enzimatisz úton lehasított oligoszacharidok szerkezetvizsgálatában a leggyakrabban a mátrixszal segített lézer deszorpciós ionizációt alkalmazzák repülési idő analízátorral (matrix-assisted laser desorption/ionization — time of flight, MALDI-TOF). A vizsgálandó vegyületet együtt kristályosítják egy UV-elnyelő anyaggal, a mátrixszal, amely a lézersugarak energiáját elnyeli és átadja a minta komponenseinek. Az így keletkező ionokat repülési idő analízátor detektálja. A MALDI-TOF ideális az 1000 Da-nál nagyobb molekulatömegű módosítatlan szénhidrátok analízisére. A semleges glikánok  $[M+Na]^+$  addukt ionjai pmol nagyságrendben kimutathatók. A savas karakterű oligoszacharidok kisebb érzékenységgel detektálhatók, mivel pozitív és negatív ionok is képződnek belőlük. A szíalsav könnyen lehasad a tömegspektrométerben, ezért ezt a jelenséget figyelembe kell venni az analízis során [88].

A szénhidrátok vizsgálatában a leggyakrabban alkalmazott mátrix a 2,5-dihidroxibenzoészav (DHB) [89]. A savas glikánok analízisében az érzékenységek növekedését tapasztalták egy másik mátrix, a 2,4,6-trihidroxiz-acetofenon (THAP)

alkalmazásával [90]. Az intakt glikoproteinek vizsgálatára a szinapinsav a legalkalmasabb mátrix [91].

### **3.3.3.1 A mintaelőkészítés szerepe az oligoszacharidok tömegspektrometriás vizsgálatában**

A MALDI-TOF vizsgálatok érzékenységét többek között az 1. táblázatban felsorolt származékképző szerek (2-AB, AA, AA-Ac, APTS, fenil-hidrazin, stb.) alkalmazásával is növelhetjük. A glikánok redukáló láncvégének módosítása számos esetben növelte meghatározásuk hatékonyságát [74, 92-95].

A minta tisztasága döntő fontosságú a MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatokban. A mintában jelen levő más komponensek, sók, pufferek gátolják a kristályosodást és az ionképződést. Eltávolításukra számos módszert alkalmaznak a dializáló, vagy ioncserélő membránoktól kezdve a grafit oszlopon át a gélkromatográfiás tisztításig [1].

Kyselova és munkatársai 2007-ben a humán szérum teljes glikántartalmát vizsgálták metasztázisos prosztaták esetén. Az enzimatis úton lehasított oligoszacharidokat permetilezték és MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel vizsgálták. A detektált oligoszacharidok intenzitás adatait statisztikai elemzésnek (főkomponens analízisnek) vetették alá, ami alapján szignifikáns eltéréseket tapasztaltak az egészséges és daganatos egyének mintái között. A permetilezett oligoszacharidok kvantitatív tömegspektrometriás vizsgálatának eredményei reprodukálhatók voltak és korreláltak a kromatográfiás meghatározások adataival [96].

Az elektro spray ionizációs (ESI) módszerek a kisebb érzékenység és a szűkebb molekulaiontartomány miatt eddig csak korlátozottan voltak alkalmazhatók a nagyobb molekulatömegű oligoszacharidok analízisében. Ezen a helyzeten a szíalsav lehasítása, a glikánok permetilezése [97, 98], vagy a redukáló láncvég származékképzése javíthat.

### **3.3.4 Glikopeptidek folyadékkromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálata**

#### **3.3.4.1 A glikoproteinek proteolitikus emésztése**

Bár az oligoszacharidok szerkezetéről részletesebb információt kapunk a kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerek segítségével, a peptidlánchoz való kapcsolódás információja a glikánok lehasításával elvész. Ezt a hiányt a visszamaradó peptidek, vagy a glikopeptidek közvetlen analizisével pótolhatjuk. A glikopeptidek előállíthatók a glikoproteinek proteolitikus emésztésével. Erre a célra leggyakrabban a tripszin enzimet alkalmazzák, amely a polipeptidláncot az arginin és lizin aminosavak mentén hasítja. Az enzimreakcióhoz a fehérje előzetes, hő, detergens, vagy sók felhasználásával végzett denaturálása, a diszulfidhidak redukálása és a tiol-csoportok alkilezése szükséges [99, 100, 101]. A fehérjék hidrolizására a tripszinen kívül a szén terminális irányából az aszparaginsav és glutaminsav aminosavaknál hasító Glu-C [28, 49], illetve a nagyobb méretű alifás és aromás aminosavaknál hasító pronáz enzimet alkalmazzák.

#### **3.3.4.2 A glikopeptidek mintaelőkészítési módszerei**

A hidrolizátum analizését általában valamilyen mintaelőkészítési lépés előzi meg, amellyel a glikopeptideket elválasztják az analízist zavaró komponensektől (detergensek, sók, stb.). Erre a célra a lektin affinitáskromatográfiát (például concanavalin A-t) alkalmazzák, amely főként a biantennás glikánokra szelektív. A glikopeptidek méretét figyelembe véve az elegyet gélkromatográfiával, vagy adott pórusméretű membránon való ultraszűréssel is tisztítják [102]. A glikopeptideket HPLC-MS mérések alapján is azonosítják az ionforrásban való bomlás során keletkező, ún. karakterisztikus oxóniumionok [például protonált *N*-acetilhexoamin (HexNAc), vagy HexNAc-Hex diszacharid] monitorozásával [103].

#### **3.3.4.3 Glikopeptidek folyadékkromatográfiás és HPLC-MS vizsgálata**

Kezdetben a glikopeptidek karakterizálását off-line RP-HPLC kromatográfiás és MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel végezték [28, 104]. Manapság a glikopeptidek legszélesebb körben használt analitikai módszere a fordított fázisú HPLC-MS technika, amely annak is köszönheti elterjedtségét, hogy a peptidek vizsgálatában alkalmazott folyadékkromatográfiás módszerek közvetlenül



adaptálhatók. A kromatográfiás elválasztás eluensei a 0,1 %TFA-tartalommal rendelkező acetonitril és víz elegyei. A HPLC készülék elektropray ionforrással rendelkező tömegspektrométerhez van kapcsolva, amelyben az eluens porlasztása után gázfázisú ionok keletkeznek. A többszörös töltésű ionok képződése lehetőséget ad nagyobb molekulatömegű vegyületek, többek között peptidok és fehérjék vizsgálatára is. A kapilláris-, vagy nano-oszlopok használatával a glikopeptidok detektálásának érzékenysége nagyságrendekkel nagyobb a hagyományos analitikai oszlopokhoz képest [103]. A tandem tömegspektrometria alkalmazásával a glikopeptidok fragmenseiből szerkezeti információhoz juthatunk [102].

#### **3.3.4.4 Néhány példa az AGP glikopeptidok vizsgálatára**

Az AGP öt kapcsolódási helyét először Treuheit és Costello vizsgálta a glikoprotein Glu-C enzim esztése után. A glikopeptidok RP-HPLC analízisét követően MALDI-TOF tömegspektrometriával határozták meg a glikopeptidok tömegét, valamint becslést adtak az egyes kapcsolódási pontokon előforduló glikánok eloszlására [49].

Juhász és Martin pronázzal esztette az AGP-t, ami gyors, egyszerű meghatározást tett lehetővé. A glikopeptidok vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával történt [105].

Sullivan és munkatársai három proteolitikus enzimmel, Glu-C-vel, kimo-tripsinnel és tripsinnel hidrolizálták az AGP-t. A glikopeptidokat RP-HPLC-MS módszerrel analízálták. Karakterisztikus oxóniumionok monitorozásával meghatározták és kigyűjtötték a glikopeptidok csúcsait, majd MALDI-TOF analízisnek vetették alá [106].

Higai és munkatársai a humán szérum AGP oligoszacharidok szerkezetét és pozícionális eloszlását vizsgálták akut és krónikus gyulladásos betegségek esetén. Az AGP-t Glu-C enzimmel esztették és a glikopeptidokat RP-HPLC módszerrel választották szét. A glikopeptid frakciók glikántartalmát PNG-áz F enzim esztést követően MALDI-TOF módszerrel analízálták, csakúgy, mint a visszamaradt peptidokat. Szignifikáns különbségeket találtak az AGP oligoszacharidok pozíció szerinti eloszlásában az egészséges és a beteg egyének szérumában [28].

## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1 Az AGP izolálása és tisztítása humán szérumból

#### 4.1.1 Anyagok

Az alkalmazott oldószerek és vegyszerek [kloroform, metanol, absz. etanol, nátrium-klorid, 2-merkaptóetanol, ecetsav (96 %-os), triklórecetsav (TCA), sósav, trisz-hidroximetil-aminometán (TRIS), glicin (puriss.), glicerin, butanol, brómfenolkék] analitikai tisztaságúak voltak (Reanal, Budapest). További reagensek [1,3-bisz-[tris(hidroximetil)metilamino]-propán (bisz-trisz-propán, min. 99 %), Coomassie Brilliant Blue (G-250), szacharóz, szinapinsav] a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest) származtak.

A kromatográfiás vizsgálatokban HPLC tisztaságú vizet, acetonitrilt és nátrium-dihidrogénfoszfátot alkalmaztam (Merck Kft., Budapest). Az *N,N,N',N'*-tetrametil-etiléndiamin (TEMED), nátrium-dodecil-szulfát (SDS), akrilamid, piperazin-diakrilamid (PDA), ammónium-perszulfát (APS) elektroforézis tisztaságúak voltak (Bio-Rad, Budapest). A preparatív műveletekben a laboratóriumban előállított kétszer desztillált vizet alkalmaztam.

#### 4.1.2 Mintavétel

A vizsgálatok az Országos Onkológiai Intézetben klinikailag igazolt, ovárium daganatos és limfómás betegek, valamint egészséges egyének (önkéntes véradók) vérérumából történtek. A reggel, éhgyomorra, könyökvénából, alvadásgátló nélkül vett és spontán megalvadtt vérmintákból az alakos elemeket centrifugálással (5000 ford/perc, 0 °C, 10 perc) távolítottam el. A felülúszó szérumokat gyűjtöttem és további felhasználásukig -20 °C-on tároltam. A módszerfejlesztésekhez gyűjtött (pool) mintákat alkalmaztam.

#### 4.1.3 Humán szérum AGP kinyerése folyadék/folyadék fázisú extrakcióval

Az eljárást Kremmer és munkatársai szerint [6] a következőképpen végeztem: 400 µl szérumhoz 400 µl 4 °C-os kétszer desztillált vizet és 6 ml kloroform és

metanol 2:1 (V/V) arányú elegyét adtam. Az emulziót 30 percen keresztül 4 °C-os jeges vízfürdőben ráztam, majd 1 ml kétszer desztillált vizet adtam hozzá és hűtve további 15 percig ráztam. Ezt követően az elegyet 5500 fordulat/perc sebességgel 25 percig centrifugáltam.

Az emulzió három fázisra vált szét (szerves, kolloid és vizes), amelyből az AGP-t tartalmazó, körülbelül 1 ml térfogatú vizes-metanolos felülúszót leszívtam. Nagyobb mennyiségű AGP kinyerése céljából az extrakció a szérum és reagensek arányosan többszörös térfogataival preparatív léptékben is elvégezhető.

#### **4.1.4 Kicsapás etanollal**

A vizes-metanolos fázishoz kétszeres térfogatú (2 ml) absz. etanolt adtam és 30 percig 4 °C-on hűtöttem. A fehér színű, pelyhes csapadékot tartalmazó folyadékot centrifugáltam (4000 fordulat/perc, 20 perc), majd a csapadékként visszamaradó fehérjét a további műveleteknek megfelelő pufferoldatban oldottam fel.

#### **4.1.5 Az AGP elválasztása ioncserélő kromatográfiával**

A humán szérum AGP-t a Kremmer és munkatársai szerinti [6] egyidejű ionerősség (nátrium-klorid) és pH gradiens elúción alapuló ioncserélő folyadék-kromatográfiával választottam el. A módszerben az alábbi eluenseket alkalmaztam:

**A eluens:** 25 mM bisz-trisz-propán puffer, pH 7,5

**B eluens:** 25 mM bisz-trisz-propán puffer, pH 9,5,  
350 mM nátrium-klorid

Az oldatokat 0,45 µm pórusméretű membránon szűrtem és felhasználásukig 4 °C-on tároltam. Az ioncserélő kromatográfia FPLC típusú középnyomású folyadékkromatográfiával (Pump-500, Controller LCC-501 Plus, Single path monitor UV-1, Pharmacia, Uppsala) történt Fractogel EMD TMAE-650 anioncserélő (Merck Kft., Budapest) oszlopon (6 x 1 cm), amelyet az előkészítés során legalább tízszeres oszloptérfogatú A eluens átáramoltásával hoztam egyensúlyba. Az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. Az UV detektálás hullámhossza 280 nm volt. A vizsgálatok szobahőmérsékleten történtek. Az AGP elválasztása céljából az etanolos kicsapás során kapott csapadékot (1-5 mg fehérje) 1 ml A eluensben oldottam föl és

a készülék mintaadagolójával (Valve V7, loop: 1 ml) az oszlopra injektáltam. A gradiens elúció a következő programmal történt:

<b>Idő (perc):</b>	0	2,5	30	35	35,5	40
<b>B eluens aránya (%):</b>	0	0	100	100	0	0

A 18–23 perc retenciós idők között megjelenő AGP tartalmú frakciókat egyesítve gyűjtöttem és vákuumban fagyaszttva (liofilizálva) szárítottam.

#### 4.1.6 Sómentesítés gélkromatográfiával

Az AGP minták sómentesítését és valamennyi további műveletben a kismolekulájú szennyező anyagok (sók, pufferek, egyéb) eltávolítását gélkromatográfiával, Sephadex G-25 oszlopon (30 x 1 cm, Pharmacia, Uppsala), Jasco HPLC készülékkel (PU-980 pumpa, LG-980-02 gradienskeverő), és Hewlett Packard 1084B UV-detektorral végeztem.

A liofilizált AGP mintát 1 ml kétszer desztillált vízben oldottam föl és injektáltam. Az elúcióra kromatográfiás tisztaságú vizet használtam. Az áramlási sebesség 2 ml/perc, a detektálási hullámhossz 215 nm volt. A holt térfogattal eluálódó fehérjefrakciót szedtem (3,0–6,0 perc között) és vákuumban fagyaszttva (liofilizálva) szárítottam. A géloszlopot 2 M nátrium-klorid-oldat, majd víz átáramoltatásával tisztítottam.

#### 4.1.7 Az AGP tisztítása festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiával

A festék ligandum affinitáskromatográfia céljára az ioncserés elválasztásokban alkalmazott FPLC készülékegyüttest alkalmaztam (4.1.5 fejezet). Az áramlási sebesség 1,0 ml/perc, az UV detektálás hullámhossza 280 nm volt. Az elválasztás eluensei a következők voltak:

**A eluens:** 10 mM nátrium-dihidrogénfoszfát puffer, pH 5,8

**B eluens:** 10 mM nátrium-dihidrogénfoszfát puffer, pH 6,8,  
2 M nátrium-klorid

Az AGP minták festék ligandum affinitáskromatográfiáját Fractogel TSK AF-Blue (Merck Kft., Budapest) töltetet tartalmazó oszlopon (7 x 1 cm) végeztem el,

amelyet 25–30 ml A eluens, átáramoltatásával hoztam egyensúlyba. A mintát 1 ml A eluensben oldva injektáltam az oszlopra. Az elúciós program a következő volt:

<b>Idő (perc):</b>	0	10	10,1	25
<b>B eluens aránya (%):</b>	0	0	100	100

A tiszta AGP gyakorlatilag az oszlop holt térfogatával, kb. 2–4 perc között oldódott le. Az AGP tartalmú frakciót liofilizáltam, majd Sephadex G-25 oszlopon gélkromatográfiával sómentesítettem. Az affinitási oszlop regenerálása a nagy sókoncentrációjú B eluenssel történt, ami leoldotta az oszlopon megkötődött szennyező fehérjéket.

#### 4.1.8 Tisztaságvizsgálat gélelektroforézissel

Az AGP minták tisztaságát Laemmli szerint [107] nátrium-dodecilszulfát – poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztem. A művelethez Protean™ II gélelektroforézis készüléket alkalmaztam (Bio-Rad, Budapest). A maximum 35 µl térfogatú AGP mintához 5 µl 2-merkaptotetanolt, 5 µl 10 %-os SDS-t és 1-2 mg szacharózt adtam. 100 °C-os vízfürdőn 5 percig melegítettem, majd 5 µl brómfenolkék festéket adtam hozzá. A mintát Hamilton-fecskendővel vittem fel a hordozó gélre. Az elektroforézis 1,5 órán át 6 mA áramerősséggel történt. A folyamatot a kék színű festéksáv haladásával követtem. A gél végül Coomassie Brilliant Blue festékkel festettem.

#### 4.1.9 Az AGP azonosítása és tisztaságának vizsgálata MALDI-TOF tömegspektrometriával

Az analízist az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriás Osztályának munkatársai végezték [S1].

#### 4.1.10 Az AGP mennyiségének meghatározása UV spektrofotometriával

A mintaelőkészítés és tisztítás különböző lépéseiben a minták fehérjetartalmát UV spektrofotometria segítségével határoztam meg. A méréseket Hitachi U-2000 spektrofotométeren 2 mm vastag kvarc küvetában végeztem. A mennyiségi mérés az AGP elnyelési maximumán, 280 nm-en, a különböző koncentrációjú (1,0; 2,5; 5,0 mg/ml) AGP-oldatokkal felvett kalibrációs görbe alapján történt.

## 4.2 Az AGP analízise és szerkezetvizsgálata

### 4.2.1 Anyagok

A humán szérum AGP molekulaszerkezetének vizsgálatában az alábbi anyagokat használtam: kromatográfiás tisztaságú víz (LiChrosolv), metanol (gradient grade), acetonitril (hypergrade), tetrahidrofuran (BHT-vel gátolt, puriss.), 2-aminobenzoesav (antranilsav), ammónium-hidrogénkarbonát, nátrium-acetát (Suprapur), bórsav (Suprapur, Merck Kft., Budapest). Trifluoecetsav, nátrium-cianoborohidrid (95 %, Sigma-Aldrich Kft., Budapest). Kénsav, foszforsav, kálium-hidrogénfoszfát, TRIS, etanol, guanidin-HCl, etiléndiamintetraecetsav (EDTA), nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 2-merkaptóetanol, nátrium-hidrogénszulfít, ecetsav (nagy tisztaságú, Reanal, Budapest), 1,2-diamino-4,5-metiléndioxibenzoldihidroklorid (DMB-2HCl, Dojindo Molecular Technologies Inc., Gaithersburg, MD), 2,5-dihidroxibenzoesav (DHB), trietil-amin (99 %) tripszin (TPCK-kezelt), ditiotritol (DTT), 4-vinilpiridin, AGP, jódcetamid (Sigma-Aldrich Kft., Budapest), Protein N-Glikozidáz F (PNG-áz F) enzim (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), N-acetil-neuraminsav (Serva, Heidelberg), A1, A2, A2F, A3 oligoszacharid standardok (Oxford GlycoSciences, Abingdon, Oxfordshire).

### 4.2.2 Humán szérum AGP szíalsavtartalmának meghatározása

Az analízis a Hara [61] által ismertetett módon történt. A mintaelőkészítés során 50 µg AGP vizes oldatához (kb. 10-40 µl) 20 µl 250 mM-os kénsavoldatot adtam, majd térfogatát 205 µl-re egészítettem ki és blokk termosztátban 80 °C-on 2 órán át hidrolizáltam. A felszabaduló szíalsavból az alábbi reagensoldat segítségével származékot készítettem:

**Származékképző oldat:** 7 mM DMB,  
1 M 2-merkaptóetanol,  
18 mM nátrium-hidrogénszulfít, vízben

A származékképzőszer oldatából 200 µl-t adtam a hidrolizált mintához, majd 2,5 órán keresztül 60 °C-on, sötétben inkubáltam. Közvetlenül ezután a mintából 40 µl-t injektáltam a HPLC készülékbe. A kalibrációs elkészítéséhez kétszer desztillált vízzel 10 µmol/ml koncentrációjú szíalsav törzsoldatot készítettem.

A kalibráló minták a következők voltak: 2000, 1000, 400, 200, 100 nmol/ml.

A kromatográfiát Supelcosil LC-18 oszlopon (25 cm x 4,6 mm, 5 µm szemecseátmérő, Supelco, Bellefonte, PA) Merck-Hitachi folyadékkromatográffal végeztem (L-6200A pumpa, AS-2000A Autosampler, D-2500 Chromato-Integrator). A detektálás Jasco FP-1520 fluoreszcenciás detektor segítségével történt. A detektálás gerjesztési hullámhossza 373 nm, az emissziós 448 nm volt. Az izokratikus elució oldószerkelege:

**Eluens:** 20,8 % metanol,  
3,3 % acetonitril,  
75,9 % víz

Az oszlop hőmérséklete 20 °C, az áramlási sebesség 0,9 ml/perc volt. A szíalsav mennyiségének meghatározása a csúcs alatti terület adatokból történt. A három vizsgált csoport (egészséges, ovárium daganatos, limfómás) szíalsav adatainak összehasonlítása nemparaméteres Kruskal-Wallis teszttel történt. A kóros csoportok szíalsav-aadatainak összevetése az egészséges csoportéval Dunn többszörös összehasonlítás tesztjével történt (GraphPad InStat 3.06).

#### 4.2.3 Humán szérum AGP emésztése PNG-áz F enzimmel

Az AGP minták enzimatisz hidrolízisét Elliott és munkatársai [31] módszere alapján, néhány módosítással a következőképpen végeztem el: 1-5 mg liofilizált AGP mintát 150 µL bidesztillált vízben oldottam föl, majd azonos térfogatú 2 mM EDTA-t tartalmazó 100 mM-os kálium-hidrogénfoszfát puffer oldatot (pH 7,5), 3 µl 10 %-os SDS és 8 µL 10 %-os 2-merkaptóetanol oldatot adtam hozzá.

A denaturáció forró vízfürdőben 5 percig tartott. Ezt követően az SDS feleslegét hűtéssel és az azt követő centrifugálással (5000 fordulat/perc, 10 perc, 4 °C) távolítottam el. A felülúszóhoz 5 U aktivitású PNG-áz F enzimet adtam az AGP minden mg-jára számolva és az oldatot 37 °C-on 24 órán át inkubáltam. Ezután a polipeptid részt háromszoros térfogatú absz. etanollal csaptam ki. A fehér, pelyhes csapadék képződését hűtéssel segítettem elő, majd centrifugálással üleptettem. Az oligoszacharidokat tartalmazó felülúszó etanoltartalmát nitrogéngáz segítségével távolítottam el. A mintát gélkromatográfiával tisztítottam, majd az oligoszacharidokat tartalmazó frakciót liofilizáltam.

#### 4.2.4 Oligoszacharidok normál fázisú HPLC analízise

A PNG-áz F enzimatisus hidrolízissal kapott oligoszacharid-keveréket antranilsavval történő származékképzés után amino-fázisú oszlopon HPLC módszerrel analizáltam. A mérés alapjául Anumula módszere szolgált [74], amelyet kismértékben módosítottam. A származékképző oldat a következőket tartalmazta:

**Származékképző oldat:** 4 % nátrium-acetát,  
2 % bórsav,  
3 % antranilsav,  
2 % nátrium-cianoborohidrid, metanolban

A minták 20–40 µl vizes oldatához 40 µl antranilsav reagenst adtam, a származékképzés 80 °C-on egy órán keresztül tartott. A minta szobahőmérsékletre hűlése után térfogatát A eluenssel 200 µl-re egészítettem ki és ebből 30 µl-t injektáltam. A HPLC analízis Supelcosil LC-18 oszlopon történt (25 cm x 0,46 mm, 5 µm, Supelco, Bellefonte, PA).

A HPLC készülék és a fluoreszcenciás detektor a szíalsav meghatározásnál leírtakkal azonos volt (4.2.2 fejezet). A detektálás gerjesztési hullámhossza 360 nm, az emissziós hullámhossz pedig 425 nm volt.

**A eluens:** 1 % tetrahydrofuran,  
2 % ecetsav, acetonitrilben

**B eluens:** 1 % tetrahydrofuran,  
5 % ecetsav,  
3 % trietil-amin, vízben

A módosított gradiens a következőképpen alakult:

<b>Idő (perc):</b>	0	10	90	100	100,1	115
<b>B eluens aránya (%):</b>	30	30	95	95	30	30

A mérés termosztálva 50 °C-on történt. Az injektálási térfogat az analitikai mérések esetén 20 µl, a preparatív kromatográfia esetén 40-80 µl volt. Az oligoszacharidok antranilsav-származékait frakcionálisan gyűjtöttem és a tömegspektrometriás vizsgálatok céljára gélkromatográfiával tisztítottam és liofilizáltam. Referenciaként különböző mono-, bi-, fukóztartalmú bi- és triantennáris szerkezetű oligoszacharid standardokat (A1, A2, A2F, A3) alkalmaztam. A molekula standardok 1 mg/ml koncentrációjú oldataiból 10 µl-t azonos mennyiségű antranilsavas



származékképző szerrel kezeltem, majd 20 µl vízzel a mintatartó edénybe mostam és belőlük 20 µl-t injektáltam. A csúcs alatti terület értékekből az oligoszacharidok relatív mennyiségi eloszlását számoltam (Microsoft Excel 2000). A három vizsgált csoport közötti eltérések szignifikanciájának vizsgálata nemparaméteres Kruskal-Wallis teszttel és Dunn teszttel történt (GraphPad InStat 3.06).

#### **4.2.5 Oligoszacharid-származékok előállítása MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára**

A humán szérum AGP mintákat a 4.2.3 fejezetben leírtak szerint PNG-áz F enzimmel emésztettem és az oligoszacharidokból antranilsav-származékot képeztem. A reagens feleslegét gélkromatográfiás módszerrel távolítottam el, és az oligoszacharidok frakcióját liofilizáltam.

A normál fázisú HPLC-vel szíalsavtartalom szerint elválasztott oligoszacharid-frakciókat kigyűjtöttem és az eluens nagy részét nitrogéngáz segítségével távolítottam el. A visszamaradt sárga színű, olajos folyadékot Sephadex G-25 gélkromatográfiás oszlopra injektáltam és az oligoszacharid-származékok frakcióját liofilizáltam.

A minták MALDI-TOF tömegspektrometriás analizisét az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai végezték [S1].

#### **4.2.6 Humán szérum AGP emésztése tripszinnel**

A proteolitikus emésztést háromféle módszer szerint végeztem el. Elsőként Mills és munkatársai eljárását alkalmaztam [100]. 0,5–1 mg AGP mintát 0,1 % SDS és 0,15 % DTT-t tartalmazó 10 mM TRIS-HCl (pH 7,0) pufferben oldottam és 90 °C-on denaturáltam/redukáltam 1 percig. Miután az elegy szobahőmérsékletűre hűlt, 50 µl 0,5 M jódetamid oldatot adtam hozzá és az alkilezést 37 °C-on, sötétben végeztem 30 percig. A reagenseket Sephadex G-25 oszlopon gélkromatográfiával távolítottam el és a glikoproteint tartalmazó frakciót liofilizáltam. A redukált és alkilezett AGP-t 0,5 ml 50 mM ammónium-hidrogénkarbonát pufferben (pH 8,5) oldottam és 20 µg tripszint adtam hozzá ugyanabban a pufferben oldva. Az inkubálást 37 °C-on 24 órán át folytattam, majd 90 °C-ra hevítettem (1 perc) a reakció leállítására.

Stubbs és munkatársai módszere alapján [101] 1 mg AGP-t 1 ml 8 M guanidin-HCl-ot tartalmazó 0,2 M TRIS-HCl (pH 8,2) pufferben oldottam. Az elegyhez 0,1 %-nyi DTT-t adtam és 1 órán át redukáltam 37 °C-on. Ezután 1 mg jódiacetamidot adtam hozzá és 1 órán át 37 °C-on, sötétben folytattam a reakciót. A módosított glikoprotein frakcióját gélkromatográfiás tisztítással nyertem ki és liofilizáltam. A redukált és alkilezett AGP-t a kiindulási összetételű puffer 0,5 ml-ében oldottam és 100 µg tripszint adtam hozzá 1,5 ml pufferben oldva. Az enzimatisz hidrolízist 24 órán át folytattam 37 °C-on.

Harmadikként Dage módszerét adaptáltam [99]. A mintaelőkészítés során 5 mg AGP mintát 1 ml 6 M guanidin-hidrokloridot tartalmazó 100 mM TRIS-HCl (pH 8,3) pufferben oldottam és 50 °C-on 30 percen át denaturáltam. Ezután 71 µl 200 mg/ml koncentrációjú DTT oldatot adtam hozzá, a redukció 37 °C-on 3 órán át tartott, majd az alkilezés 71 µl 4-vinilpiridin hozzáadásával 37 °C-on 30 percen át történt. A denaturálószer 3 ml desztillált víz hozzáadásával kicsaptam, centrifugáltam (10000 rpm, 30 perc), majd a felülszót leszívtam és G-25 oszlopon sómentesítettem. A holt térfogattal eluálódó frakciót gyűjtöttem és liofilizáltam. Az alkilezett AGP-t 0,5 ml 200 mM-os ammónium-hidrogénkarbonát pufferben (pH 8,5) oldottam föl és 10 mg/ml koncentrációjú tripszin oldatból 20 µl-t adtam hozzá. Az inkubálás 37 °C-on 24 órán át történt.

Az analízis előtt az elegy ultraszűrése Microcon centrifugaszűrővel történt (Amicon, „cut-off” 10 kDa, 10000 rpm, 20 perc) és tisztítására Isolut C18 szilárd fázisú extrakció (SPE) oszloppal (IST) került sor. Az SPE oszlopot metanollal kondicionáltam és 0,1 % TFA vizes oldatával ekvilibráltam. A mintát ezzel az oldattal vittem fel az oszlopra és mosása is 0,1 % TFA-oldattal történt. A tripszines emésztés termékeit acetonitril:0,1 % TFA 7:1 arányú elegyével eluáltam és nitrogén áramban szárítottam be.

#### **4.2.7 A tripszines emésztési termék RP-HPLC (mikropreparatív) elválasztása**

Az AGP minták tripszines emésztésének eredményeként kapott peptid-glikopeptid elegyek mikropreparatív elválasztását VYDAC Selectapore 300P „wide-pore” C18 fordított fázisú oszlopon (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) ISCO

gyártmányú HPLC készülékkel végeztem (2350 pumpa, 2360 gradiens programozó, V<sup>4</sup> típusú UV-detektor). Az elválasztás eluensei a következők voltak:

**A eluens:** 0,1 % TFA vízben

**B eluens:** Acetonitril

A gradiens a következőképpen alakult:

<b>Idő (perc):</b>	0	10	90	90,1	100
<b>B eluens aránya (%):</b>	15	15	50	15	15

A mérés szobahőmérsékleten történt 215 nm-en való UV-detektálással. Az injektált mintatérfogat 10 µl volt. Az adatokat Jasco-BORWIN 1.50 kromatográfiás szoftverrel gyűjtöttem. A kromatográfia során gyűjtött frakciókat liofilizáltam. PNG-áz F emésztésüket és az antranilsavval történő származékképzést követően megvizsgáltam oligoszacharid tartalmukat (lásd: 4.2.4 fejezet).

#### **4.2.8 A tripszines emésztési termék on-line HPLC- MS vizsgálata**

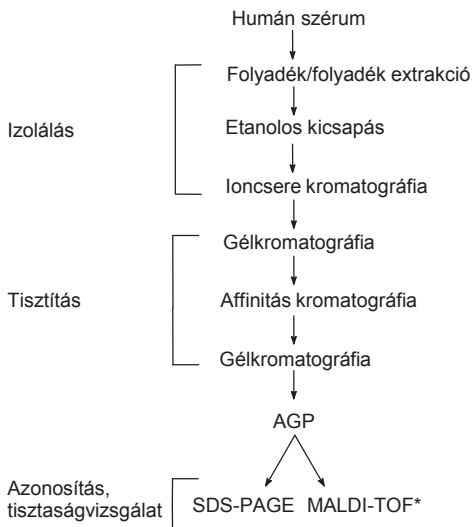
Az általam készített tripszines hidrolizátumok on-line HPLC-MS vizsgálatát az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai végezték [S2].

## 5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK

Az AGP oligoszacharid-szerkezetének vizsgálata szoros kutatói együttműködés keretein belül történt. Az általam végzett mintaelőkészítési és folyadékkromatográfiás vizsgálatok az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztályán zajlottak, míg a minták tömegspektrometriás elemzését az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai végezték.

### 5.1 A humán szérum AGP izolálása és tisztítása

A humán szérum AGP-tartalmának kinyerésére és tisztítására olyan, ún. biokompatibilis módszereket alkalmaztam, vagy dolgoztam ki, amelyek a lehető legkisebb mértékben degradálják a makromolekulát. Az AGP molekulaszervezetének további vizsgálata céljából a minták előkészítése a 6. ábrán felvázolt munkafolyamatok szerint történt. A kromatográfiás lépések között a minták liofilizálására került sor.



6. ábra Az AGP előállítása humán szérumból  
\*MTA KK Tömegspektrometria Osztály

### 5.1.1 A humán szérum AGP-tartalmának kinyerése folyadék/folyadék fázisú extrakcióval

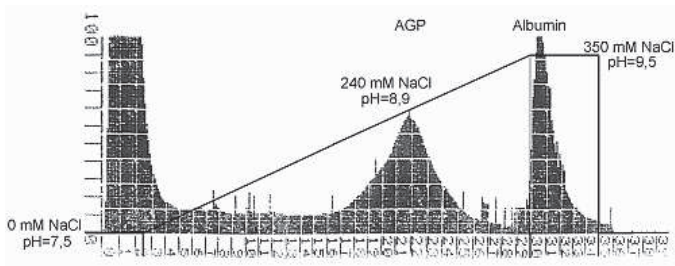
A humán szérum AGP izolálásának kiinduló pontja a Kremmer és munkatársai által korábban leírt nem elegyedő folyadékfázisú extrakciós módszer volt [6]. Az eljárás lényege, hogy a kloroformot, metanolt és a vízzel hígított humán szérumot tartalmazó hűtött és rázatott elegy centrifugálás után három fázisra válik szét. Az AGP-t (és kevés, egyéb kontamináns fehérjét) tartalmazó vizes-metanolos felülúszó képezte a további vizsgálatok tárgyát.

### 5.1.2 Kicsapás etanollal

A vizes-metanolos extraktum fehérjetartalmának alkoholos kicsapása az AGP minták előkészítésének egyik lényeges művelete, amely egy lépésben tette lehetővé a humán szérum egyéb, kis molekulatömegű oldott (szennyező) anyagainak eltávolítását és a minta bekonzentrálását. Ezt követően a csapadék alkalmas közegben (pH, ionerősség, puffer) történő feloldása a további műveletek céljára megfelelő mintát eredményezett.

### 5.1.3 Az AGP elválasztása ioncserélő kromatográfiával

A humán szérum AGP preparatív léptékű anioncserélő folyadékkromatográfiás elválasztását a korábban leírt mikroanalitikai [6] módszer alapján a kombinált pH-ionerősség elúciós gradiens módosításával valósítottam meg. Az elválasztás kromatogramja a 7. ábrán látható.

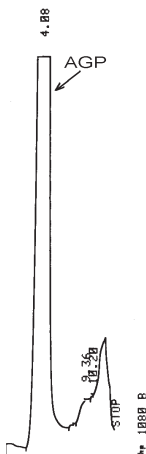


7. ábra A humán szérum AGP elválasztása preparatív ioncserélő kromatográfiával

A gradiens elúció körülményei között az AGP a pH 8,7-9,0 és 220-250 mM NaCl tartományban (18 és 23 perc retenciós idő között) jelent meg, amit kb. 30 percnél az albumin csúcsa követett.

#### 5.1.4 Sómentesítés gélkromatográfiával

A gélkromatográfiás tisztítás az AGP szerkezetvizsgálatának egyik sarkalatos pontja. Több eljárás, mint például az enzimreakciók és a tömegspektrometriás mérések nagytisztaságú mintát igényelnek. Az általam használt Sephadex G-25 töltettel az 1000-5000 Da-nál kisebb molekulatömegű anyagok (sók) teljesen eltávolíthatók. A 8. ábra az ioncserélő kromatográfia során nyert AGP frakció gélkromatográfiás tisztításának jellegzetes képét mutatja. Ezen kívül valamennyi, később felsorolt esetben megfelelő tisztítási lépésként tudtam alkalmazni a G-25 oszlopon történő gélkromatográfiát.

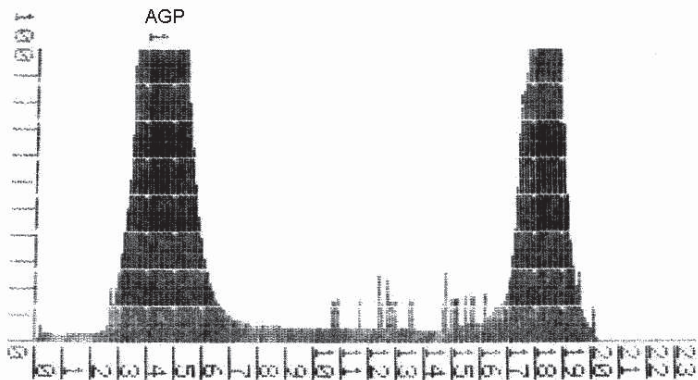


8. ábra Humán szérum AGP gélkromatográfiás tisztítása  
Sephadex G-25 oszlopon

### 5.1.5 Az AGP tisztítása festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiával

A fentiekben tárgyalt módszerekkel nyert AGP minták különböző egyéb kontamináns fehérjéket, főként a humán szérumban nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben jelenlévő albumint tartalmazhatnak. A humán szérum AGP további tisztítására egy újabb elválasztástechnikát, a festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiát alkalmaztam. Az eljárás lényege, hogy optimálisan megválasztott kísérleti körülmények (pH, ionerősség, ionminőség) között az affinitási oszlopról a humán szérum AGP szelektíven leoldódik, míg az egyéb szennyező fehérjék visszamaradnak.

A 9. ábra a humán szérum AGP festék ligandum affinitáskromatográfiás tisztításának jellegzetes képét mutatja. A tiszta AGP gyakorlatilag az oszlop holt térfogatával, kb. 3-6 perc között oldódott le, míg a szennyező albumin és egyéb (minor) szérumfehérjék 17 és 19 perc között jelentek meg. Az AGP-t tartalmazó frakciót liofilizáltam, majd Sephadex G-25 oszlopon gélkromatográfiával sómentesítettem.

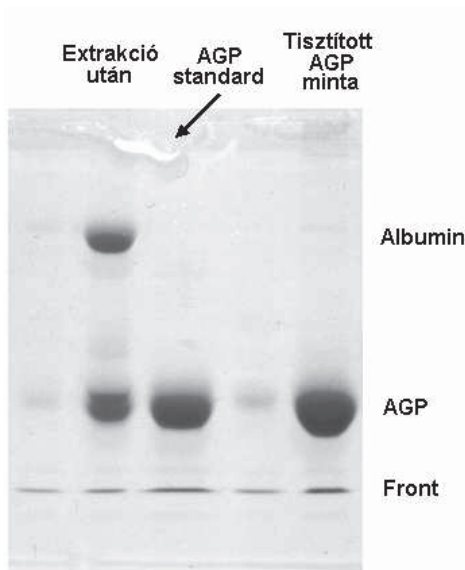


9. ábra A humán szérum AGP tisztítása festék ligandum affinitáskromatográfiával

## 5.2 Azonosítás és tisztaságvizsgálat

### 5.2.1 SDS-PAGE gélelektroforézis

Az AGP azonosítására és a mintaelőkészítés különböző fázisaiban (ioncserélő és festék ligandum affinitáskromatográfia, enzimreakciók, stb.) a minták tisztaságának ellenőrzésére az SDS-PAGE gélelektroforézist alkalmaztam. A gélrt Coomassie Brilliant Blue festékkel festettem meg, amely a kisebb mennyiségű szennyezések érzékeny detektálását is lehetővé tette. A 10. ábrán egy kloroform-metanol-vizes extrakció utáni és egy tisztított AGP minta gélelektroforézis felvétele látható AGP standarddal összehasonlítva.



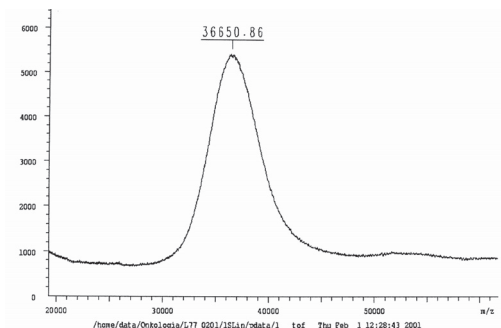
10. ábra A humán szérum AGP minták tisztaságvizsgálata SDS-PAGE gélelektroforézissel

### 5.2.2 Azonosítás és tisztaságvizsgálat MALDI-TOF tömegspektrometriával

Az elemzést az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai végezték. A tömegspektrometria információt adott az AGP minták molekulatömegéről és tisztaságáról. A 11. ábra szerint a fehérje molekuláris



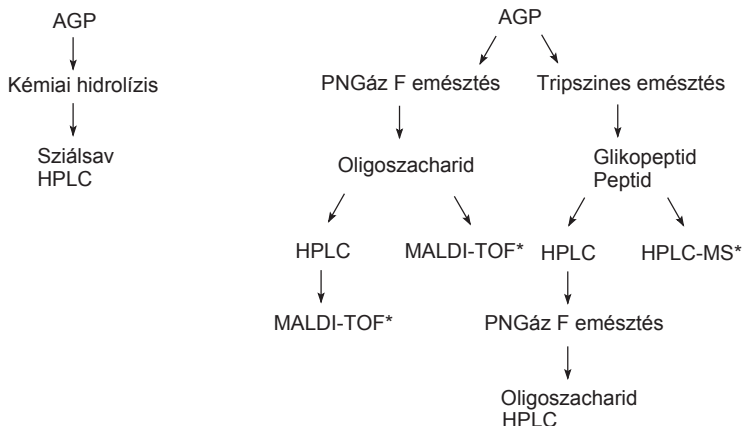
heterogenitásának következtében az AGP molekulatömegére széles sávban,  $m/z$  33000 és 41000 közötti értékek adódtak. A mérések során az eloszlási görbe maximuma kb.  $m/z$  36500 volt.



11. ábra A humán szérumból izolált és tisztított AGP MALDI-TOF tömegspektruma (MTA KK Tömegspektrometria Osztály) [S1]

### 5.3 Az AGP analízise és szerkezetvizsgálata

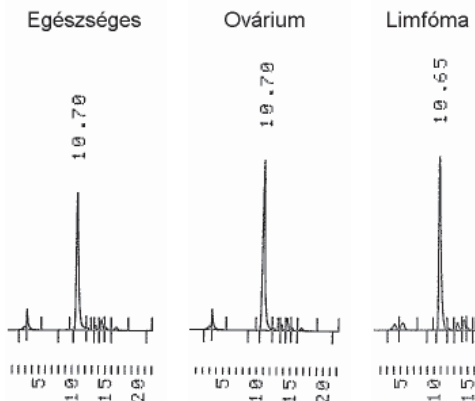
A humán szérumból izolált és tisztított AGP minták szerkezetvizsgálata a 12. ábrán felvázoltak szerint történt.



12. ábra A humán szérumból izolált és tisztított AGP oligoszacharid szerkezetének vizsgálati stratégiája  
\*MTA KK Tömegspektrometria Osztály

### 5.3.1 Az AGP szíalsavtartalmának meghatározása

Az oligoszacharidok láncvégi szíalsavtartalmát savas hidrolízissel szabadítottam fel és mennyiségét a 4.2.2 fejezetben ismertetett, fordított fázisú HPLC módszerrel határoztam meg. A 13. ábrán a három vizsgált csoportból származó AGP minták szíalsavtartalmának HPLC elválasztása látható.



13. ábra AGP szíalsavtartalmának (DMB-származékának) RP-HPLC elválasztása fluoreszcenciás detektálással

A 2. táblázat az egészséges, ovárium daganatos és limfómás humán szérumban AGP minták relatív szíalsavtartalmát foglalja össze. Eredményeim szerint az egészséges egyénektől származó AGP minták szíalsavtartalma az AGP teljes tömegére vonatkoztatva 7,23 %-nak adódott. Az ovárium daganatos mintákban ez az arány 8,70 %-ra, míg a limfómás mintákban 9,73 %-ra nőtt. Ez 20 ( $p < 0,05$ ), illetve 35%-os ( $p < 0,01$ ) növekedést jelent az egészséges egyének mintáihoz képest, ami szignifikáns emelkedést jelez a kóros mintákban. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a vizsgált kórcsoportokban az AGP megnövekedett szíalsavtartalma a magasabb elágazásszámú tri- és tetraantennáris oligoszacharid-szerkezetek felszaporodását jelzi.

2. táblázat Relatív szíalsavtartalom az AGP minták tömegére vonatkoztatva

Egészs.	(tömeg%)	Ovrium	(tömeg%)	Límfóma	(tömeg%)
NP 1.	5,70	OP 1.	9,23	LP 1.	11,91
NP 2.	6,35	OP 2.	10,75	L-220	8,74
NP 3.	8,15	6113	9,26	L-158	6,55
K-O	8,10	6047	10,24	L-161	8,40
K-1	6,91	5777	7,42	L-274	11,36
KK	7,31	6177	8,68	L-308	11,44
KT	7,71	6199	8,38	Átlag±SD	9,73 ± 2,15
KE	7,57	6238	8,26		
Átlag±SD	7,23 ± 0,86	6239	7,88		
		6242	8,41		
		6245	8,35		
		6247	8,20		
		6250	8,08		
		Átlag±SD	8,70 ± 0,94		

### 5.3.2 Az AGP emésztése PNG-áz F enzimmel

A humán szérum AGP szénhidráttartalmának kémiletes hidrolízise céljából PNG-áz F specifikus proteolitikus enzimet alkalmaztam, amely a peptidlánc aszparagin szekvenciáihoz kapcsolódó glikánláncokat szelektíven lehasítja, és lehetővé teszi az így keletkező oligoszacharidok kinyerését. A mintaelőkészítés során etanollal csaptam ki a fehérjét, centrifugáltam, majd az alkoholos felülúszót bepárlás után gélkromatográfiával tisztítottam.

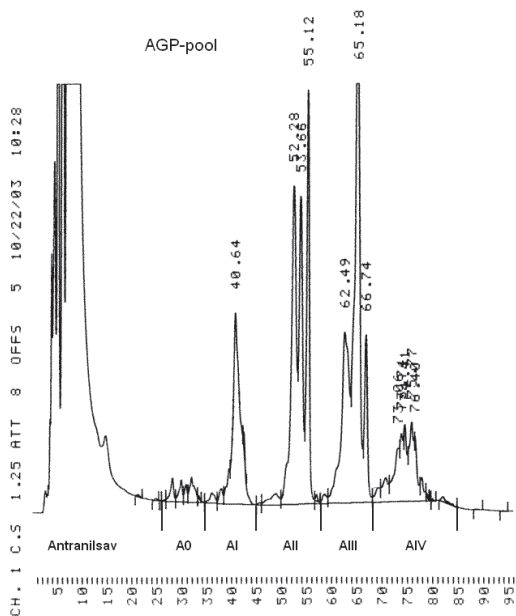
### 5.3.3 Oligoszacharidok normál fázisú HPLC analízise

A PNG-áz F enzimatisz hidrolízissel kapott oligoszacharid-keveréket antranilsavval történő származékképzés után polimer alapú amino-fázisú oszlopon HPLC módszerrel kromatografáltam. Az analízishez azért volt szükség speciális hordozóra, mert a szilika alapú amin-oszlop az elválástáznál alkalmazott erősen savas körülmények között degradálódik. A polimer alapú oszlopot hosszabb ideig lehetett megbízhatóan alkalmazni, minőségének romlását végül a csúcsok közötti

felbontás és a retenciós idő csökkenése jelezte. A jellegzetes profillal rendelkező kromatogram oligoszacharid-csoportjainak beazonosítását a kolonna minőségének változása nem zavarta jelentősen, így egy ideig preparatív célokra még használható volt.

Anumula és munkatársai HPLC eljárásának [74, 75] kisebb módosításával, a fluoreszcens detektálásnak köszönhetően nagy érzékenységgel határoztam meg az oligoszacharid-keverék összetevőinek mennyiségét. Az oligoszacharidok elválasztása a molekulaméret mellett a szíalsavtartalmuknak megfelelő poláris (ionos) kölcsönhatásokon alapul. Egy gyűjtött AGP oligoszacharid minta („AGP-pool”) kromatogramja a 14. ábrán látható.

A normál fázisú folyadékkromatográfiás (NP-HPLC) módszer, az elválasztás feltételezhető mechanizmusa szerint az oligoszacharidok antranilsav-származékait szíalsavtartalmuk alapján csoportokban választja szét. Az „AGP-pool” minta kromatogramjának elején 3 és 17 perc között a származékképzőszer (antranilsav) feleslege látható. Az első csoportot (A0) alkotó glikánok 26 és 34 perc között, míg a második csoport (AI) komponensei 35 és 45 perc között jelentek meg. Az AII frakció csúcsait 46 és 59 perc között, az AIII-ét pedig 59 és 69 perc között detektáltam. Utolsóként az AIV csoport komponensei jelentek meg 69 és 79 perc között. A szerkezet igazolása céljából a fent megjelölt frakciókat csoportonként gyűjtöttem és az eluent nitrogéngáz segítségével távolítottam el. A frakciókat a szárítás után gélkromatográfiával tisztítottam meg szennyezéseitől a tömeg-spektrometriás vizsgálatok számára.

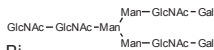


14. ábra Gyűjtött humán szérumban AGP oligoszacharid minta (AGP-pool) szemipreparatív normál fázisú HPLC analízise

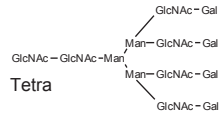
### 5.3.4 Az oligoszacharid-frakciók azonosítása

A glikánok HPLC frakcióinak azonosítását az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel végezték. A vizsgálatokban a glikánok antranilsav-származékai érzékenyen detektálhatók voltak. Az eredmények szerint a frakciók főbb összetevői a 15. ábrán láthatók.

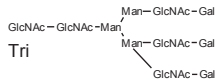
**A0 frakció:**



Bi

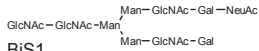


Tetra



Tri

**A1 frakció:**

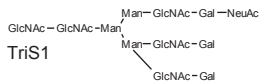


BiS1

A1 standard

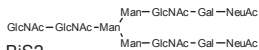


TetraS1



TriS1

**A11 frakció:**

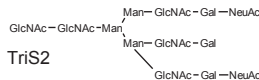


BiS2

A2 standard

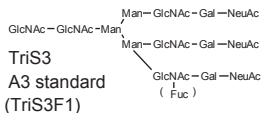


TetraS2



TriS2

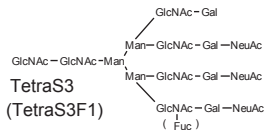
**A111 frakció:**



TriS3

A3 standard

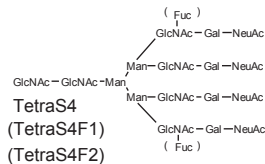
(TriS3F1)



TetraS3

(TetraS3F1)

**AIV frakció:**



TetraS4

(TetraS4F1)

(TetraS4F2)

15. ábra AGP-pool oligoszacharid minta NP-HPLC frakcióinak MALDI-TOF tömegspektrometriával azonosított főbb komponensei (MTA KK Tömegspektrometria Osztály)

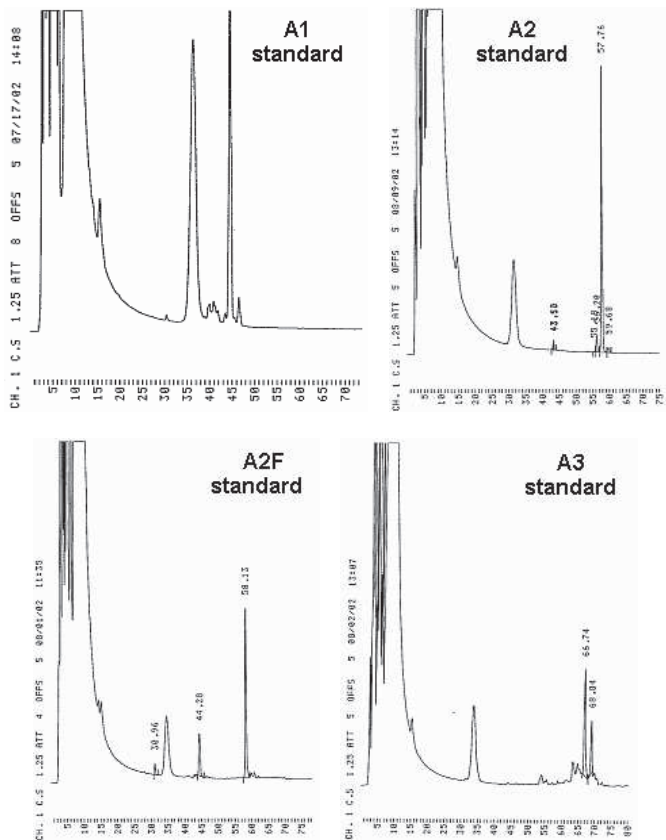
A humán szérum AGP oligoszacharidjai két, három, vagy négy elágazást tartalmaznak. Ezek alapján különböztetünk meg bi-, tri- és tetraantennáris szerkezeteket (Bi, Tri, Tetra). A láncvégekhez egy, két, három, vagy négy szíálsav kapcsolódhat, amit az S1, S2, S3 és S4 szimbólumokkal jelöltem. Bizonyos szerkezetekben egy vagy két fukóz is kapcsolódhat valamelyik N-acetil-glükózamin egységhez (F1, F2). Ezek kapcsolódási pozíciója nem meghatározott, az ábrán az egyszerűség kedvéért a molekulák egy lehetséges változatát tüntettem fel.

Az A0 frakció szíálsavat nem tartalmazó bi-, tri- és tetraantennáris szerkezeteket foglalt magában. Az AI csoport összetevői egy szíálsavat tartalmazó bi-, tri- és tetraantennáris szerkezetű glikánok voltak. Az AII frakció két szíálsavat hordozó bi-, tri- és tetraantennáris oligoszacharidokat tartalmazott. Az AIII frakcióban főként a három szíálsavval rendelkező tri- és tetraantennáris glikánok, valamint fukóztartalmú megfelelőik voltak jelen. Az AIV minta fő komponensei a négy szíálsavat tartalmazó tetraantennáris szerkezetű oligoszacharidok és azok fukozilált változatai voltak. A frakciókban alacsonyabb szíálsavszámú szerkezetek is kimutathatók voltak, amely a csoportok minimális átfedésére, valamint a minták HPLC analízise, a frakciók feldolgozása, vagy tömegspektrometriás vizsgálatuk során fellépő bomlásukra utalhat [88].

Az eredmények szerint megállapítható, hogy az oligoszacharid frakciók MALDI-TOF tömegspektrumai alátámasztják a retenció idő alapján az egyes csoportokhoz rendelt szíálsavtartalmat.

### **5.3.5 Oligoszacharid standardok NP-HPLC vizsgálata**

Az AI-IV frakciók azonosítására — a tömegspektrometriás igazolással párhuzamosan — a kereskedelembe kapható oligoszacharid standardokat (15. ábra) is alkalmaztam. A normál fázisú HPLC vizsgálatok kromatogramjai a 16. ábrán láthatók. Az egy szíálsavval rendelkező A1 standard 44,2 percnél, a két szíálsavtartalmú A2, valamint A2F standard 57,8, illetve 58,1 percnél, az A3 standard pedig 66,8 és 68,9 percnél két csúcsot adva jelent meg. Az eredmények összhangban vannak a frakciók tömegspektrometriás vizsgálatával kapottakkal.

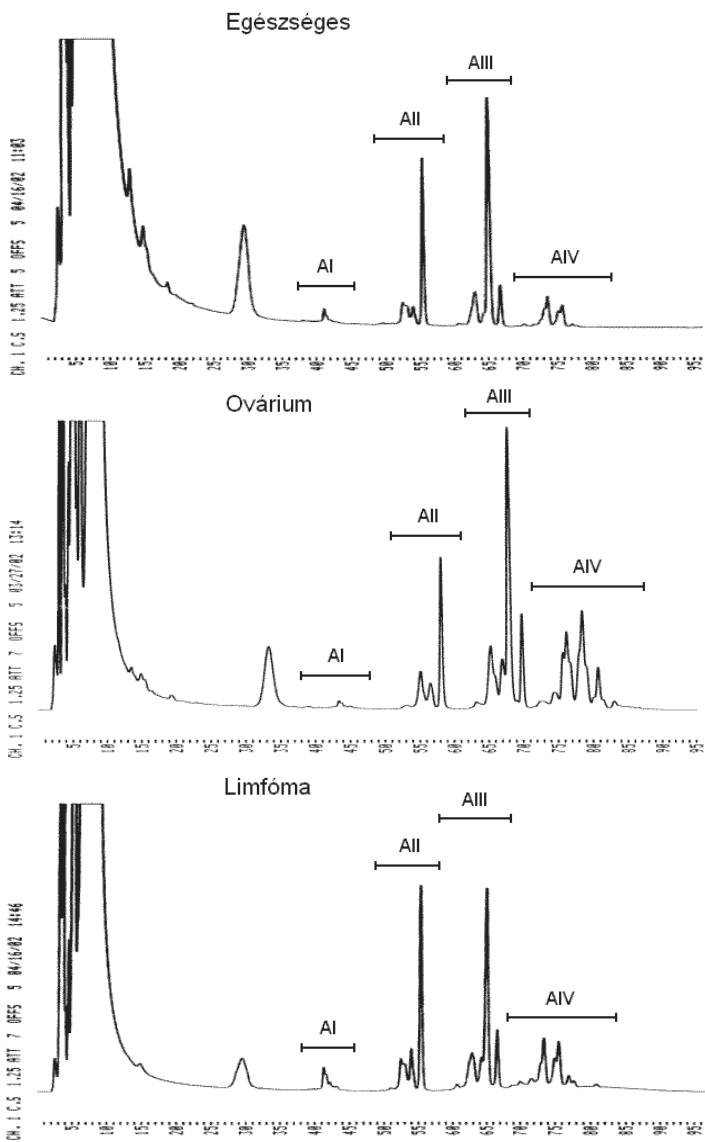


16. ábra Oligoszacharid standardok antranilsav-származékainak NP-HPLC vizsgálata

### 5.3.6 Egyedi AGP oligoszacharid minták HPLC analízise

A daganatos megbetegedések okozta változások felderítésére 21 egészséges, 27 ovárium daganatos és 22 limfómás egyén szérumban AGP oligoszacharid frakcióját állítottam elő enzimatisz hidrolízissel, és analízáltam NP-HPLC módszerrel. Az egyedi minták antranilsav-származékai nagy felbontással váltak szét és érzékenyen detektálhatók voltak. (Kór)csoportonként egy-egy demonstratív kromatogram látható a 17. ábrán.





17. ábra Oligoszacharidok antranilsav-származékának NP-HPLC analízise egészséges (fent), ovárium daganatos (középen) és limfómás (lent) humán szérum AGP mintákból

Az egészséges és a két vizsgált kórcsoport mintáinál az egy frakcióhoz tartozó csúcs alatti területeket összeadtam és az összes csúcs alatti terület százalékában fejeztem ki. A mérési eredményeket a 3-5. táblázatok foglalják össze.

**3. táblázat A szérum AGP oligoszacharidok eloszlása szíalsavtartalmuk szerint, az összes csúcs alatti terület %-ában.**  
(Egészséges, kontrol egyének, n = 20)

<b>Minta</b>	<b>A0</b>	<b>A1</b>	<b>AII</b>	<b>AIII</b>	<b>AIV</b>
ANORH	0,0	1,3	26,3	52,3	20,0
ANKT	0,0	1,5	25,7	49,4	23,5
ANS2	0,0	2,2	25,2	49,9	22,8
ANS2	0,0	2,2	25,2	49,9	22,8
ANP	1,7	10,7	30,9	42,2	14,6
ANP-I	0,0	13,7	38,6	38,4	9,4
ANP-IIa	0,0	2,6	27,7	47,5	22,2
ANP-IIb	0,8	2,4	30,3	51,1	15,4
ANP-IIc	0,0	3,8	27,1	44,8	24,4
ANPIV	0,0	13,1	33,0	40,4	13,5
ANPV	3,6	13,2	27,2	41,9	14,2
ANPVI	0,3	5,3	30,7	46,5	17,4
ANPIX	0,5	8,2	33,2	41,0	17,2
ANPXI	0,6	8,2	34,3	43,4	13,5
ANPXII	0,0	2,9	30,4	48,7	18,0
ANPXIIIP	0,0	5,1	26,9	47,4	20,8
ANPXIV	0,0	1,2	25,9	51,7	21,4
ANPXV	0,0	0,4	21,6	53,0	25,1
ANPXVI	0,0	1,3	22,5	55,2	21,1
ANPLII	0,0	0,0	25,8	51,5	22,8
ANPLIV	0,0	1,7	35,5	51,0	11,9
<b>Átlag±SD</b>	<b>0,4±0,9</b>	<b>4,9±4,6</b>	<b>28,9±4,4</b>	<b>47,4±4,8</b>	<b>18,4±4,6</b>

**4. táblázat A szérumban AGP oligoszacharidok eloszlása  
szélségtartalmuk szerint, az összes csúcs alatti terület %-ában.  
(Ovário daganatos egyének, n = 27)**

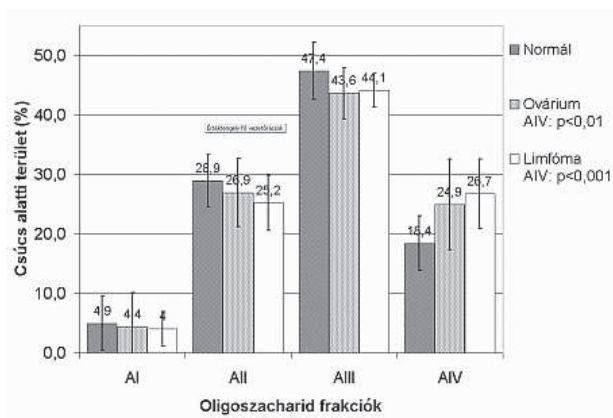
<b>Minta</b>	<b>A0</b>	<b>A1</b>	<b>AII</b>	<b>AIII</b>	<b>AIV</b>
A6367	0,0	4,3	32,5	48,5	14,7
A6374	0,0	8,1	42,5	40,9	8,6
A6375	0,0	0,7	17,6	43,8	38,0
A6632	0,0	1,8	19,7	46,7	31,9
A6762	0,0	3,7	23,4	45,9	27,1
A6768	0,0	31,1	34,5	26,5	8,0
A6948	0,0	0,9	27,7	42,8	28,7
A7821	0,0	2,5	20,5	44,6	33,0
A7874	0,0	2,2	21,8	42,1	33,8
A7916	0,0	3,6	27,9	45,3	23,3
A8121	0,0	4,4	29,9	39,9	25,9
A8291	0,0	4,7	32,8	42,3	20,3
A8307	1,4	5,4	23,8	45,5	24,1
A8332	0,0	3,2	25,3	42,7	28,7
A8341	0,1	4,7	27,4	42,5	25,3
A8352	0,1	2,0	25,2	43,1	29,8
A8359	0,0	4,9	31,4	42,0	21,8
A8364	0,0	5,3	37,3	45,3	12,2
A8386	1,4	5,7	27,3	43,7	21,8
A8411	1,4	6,1	27,9	46,6	18,1
A8514	0,6	3,1	22,2	41,3	32,4
A8518	0,2	4,2	29,7	41,6	24,4
A8564	0,0	1,7	28,5	43,8	26,0
A8655	0,0	2,1	21,5	43,7	32,9
A8696	0,1	3,1	24,4	48,1	24,4
A8814	0,0	0,0	22,5	52,1	25,5
A8980	0,0	0,5	20,9	46,5	32,4
<b>Átlag±SD</b>	<b>0,2±0,4</b>	<b>4,4±5,7</b>	<b>26,9±5,8</b>	<b>43,6±4,3</b>	<b>24,9±7,6</b>

**5. táblázat A szérum AGP oligoszacharidok eloszlása  
szíalsavtartalmuk szerint, az összes csúcs alatti terület %-ában.  
(Límfómas egyének, n=22)**

<b>Minta</b>	<b>A0</b>	<b>AI</b>	<b>AII</b>	<b>AIII</b>	<b>AIV</b>
AL-348	1,1	8,1	34,9	39,5	16,4
AL-352	0,0	9,3	30,4	40,4	19,9
AL-353	0,0	6,4	29,7	46,6	17,4
AL-388	1,2	5,3	23,9	41,0	28,5
AL-507	0,0	3,5	17,7	44,7	34,2
AL-508	0,0	6,5	21,0	42,0	30,5
AL-515	0,0	2,4	25,0	46,6	25,4
AL-558	0,0	0,8	23,7	46,7	28,8
AL-737	0,0	2,9	21,5	47,0	28,6
AL-761	0,0	2,5	18,7	41,9	37,0
AL-764	0,0	3,8	24,8	45,1	26,4
AL-778	0,0	3,1	21,2	42,9	32,9
AL-801	0,0	4,3	31,5	41,7	22,7
AL-841	0,0	12,2	32,3	40,2	15,4
AL-842	0,0	4,0	25,4	42,8	27,9
AL-879	0,0	2,1	22,8	46,9	28,4
AL-891	0,0	1,1	29,3	45,8	24,0
AL-893	0,0	2,2	22,7	42,8	32,4
AL-906	0,0	1,7	24,1	42,6	31,7
AL-959	0,0	0,3	19,2	49,9	30,7
AL-962	0,0	1,3	26,4	47,4	25,0
AL-982	0,0	3,6	27,9	45,2	23,5
<b>Átlag±SD</b>	<b>0,1±0,3</b>	<b>4,0±2,9</b>	<b>25,2±4,7</b>	<b>44,1±2,8</b>	<b>26,7±5,8</b>

A 3-5. táblázatok adatai szerint a szíalsavat nem tartalmazó oligoszacharidok (A0) csak néhány minta esetében és csekély mennyiségben jelentek meg, amelyek spontán bomlás során is keletkezhetnek. Az egy szíalsavat tartalmazó szerkezeteket (AI) mindhárom csoportnál ki lehetett mutatni 4-5 % körüli mennyiségben. A két szíalsavat hordozó (AII), zömében biantennáris szerkezetű oligoszacharidok 25-29 % közötti arányban voltak jelen.

Az oligoszacharidok legnagyobb részét a három szialsavval rendelkező molekulavariánsok képezték (AIII). Míg az egészséges egyénektől és a különböző kórcsoportokból származó AGP mintákban a három szialsavat tartalmazó oligoszacharidok aránya (43-47%) közel azonos volt, a kóros mintákban a négy szialsavat tartalmazó, tetraantennáris (AIV) szerkezetek relatív mennyisége szignifikánsan növekedett. Az egészséges egyénekhez képest (18,4%) az ovárium daganatos betegek AGP mintái 24,9%-ban, a limfómás betegek mintái 26,7%-ban tartalmaztak AIV oligoszacharidokat, ami 35%-os ( $p<0,01$ ), illetve 45%-os ( $p<0,001$ ) növekedést jelent a molekula finomszerkezetében. Az eredményeket a 18. ábra összegzi.



**18. ábra A humán szérumban AGP oligoszacharidok szialsavtartalom szerinti átlagos eloszlása a vizsgálati csoportokban**

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a humán szérumban AGP-ben ovárium daganatos és limfóma megbetegedés esetén négy szialsavat tartalmazó (tetraantennáris) oligoszacharidok aránya szignifikánsan növekedett.

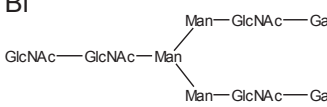
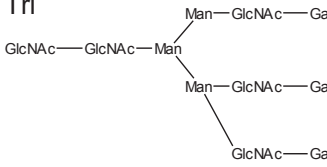
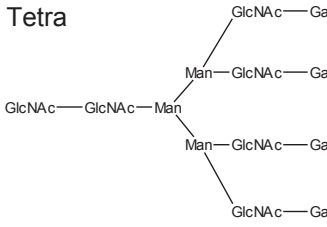
### **5.3.7 Oligoszacharid-származékok előállítás MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára**

A daganatos megbetegedések okozta változások nyomon követésére 12 egészséges, 16 ovárium daganatos és 15 limfómás egyén szérum AGP oligoszacharid mintáit állítottam elő enzimatisz hidrolizissal MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatok számára. Az érzékeny detektálás érdekében származékképzésre volt szükség, ezért a glikánok antranilsav-származékait állítottam elő. A mintaelőkészítés és származékképzés a 4.2.3 és 4.2.4 fejezetben leírtak szerint történt azzal a különbséggel, hogy a művelet végén az antranilsav származékképző reagens feleslegét gélikromatográfiás úton távolítottam el és liofilizáltam.

Az egyedi oligoszacharid minták tömegspektrometriás vizsgálatát az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztályának munkatársai végezték. A humán szérum AGP-ben talált oligoszacharidok szerkezetét és elnevezését a 6. táblázat foglalja össze. A vizsgált csoportokban a bi-, tri- és tetraantennáris szerkezetek intenzitásaránya jellegzetes eloszlást mutatott. Legnagyobb intenzitással a biantennáris oligoszacharidok jelentek meg. Sajátos eltéréseket találtunk azonban a kóros és az egészséges kontrol minták között. Egyrészt különbség mutatkozott a tetraantennáris szerkezetek arányában, miszerint ez magasabb volt az ovárium daganatos és limfómás esetekben. Másrészt a fukóztartalmú szerkezetek kétháromszoros intenzitással jelentek meg a kóros mintákban az egészségesekéhez képest [S1]. A tömegspektrometriás eredmények további részletes elemzése nem képezi tárgyát ennek a dolgozatnak.

Eredményeink azt mutatják, hogy az egészséges egyénnel összehasonlítva az ovárium daganatos és limfómás betegek szérum AGP mintáiban magasabb a nagyobb elágazásszámú és méretű, valamint a nagyobb fukóztartalmú oligoszacharidok aránya.

6. táblázat A humán szérumban azonosított bi-, tri- és tetraantennás szerkezetű oligoszacharidok [S1]  
(MTA KK Tömegspektrometria Osztály)

Antennás szerkezet	Oligoszacharidok <sup>a</sup>	Sziálsav	Fukóz
<b>Bi</b> 	Bi	–	–
	BiS1	1	–
	BiS2	2	–
<b>Tri</b> 	Tri	–	–
	TriF1	–	1
	TriS1	1	–
	TriS1F1	1	1
	TriS2	2	–
	TriS2F1	2	1
	TriS3	3	–
	TriS3F1	3	1
<b>Tetra</b> 	Tetra	–	–
	TetraF1	–	1
	TetraS1	1	–
	TetraS1F1	1	1
	TetraS2	2	–
	TetraS2F1	2	1
	TetraS3	3	–
	TetraS3F1	3	1
	TetraS4	4	–
	TetraS4F1	4	1
	TetraS4F2	4	2

<sup>a</sup>S: sziálsavtartalom, F: fukóz-tartalom

### 5.3.8 Az AGP emésztése tripszinnel

Az AGP peptidláncának tripszinnel való hasítását háromféle eljárás szerint végeztem el (4.2.6. fejezet). Az enzimreakciókhoz gyűjtött (pool) AGP mintákat használtam.

A denaturálást az első módszer esetében SDS jelenlétében végeztem, a redukálás DTT, az alkilezés pedig jódiacetamid hozzáadásával történt. Az enzimreakció során a tripszin:AGP arány 1:25 volt [100].

A második módszer szerint guanidin-HCl jelenlétében történt a denaturálás. A redukálás és alkilezés az előbbiekhöz hasonlóan DTT és jódiacetamid hozzáadásával történt. Az inkubálás során az enzim:AGP arány 1:10 volt [101].

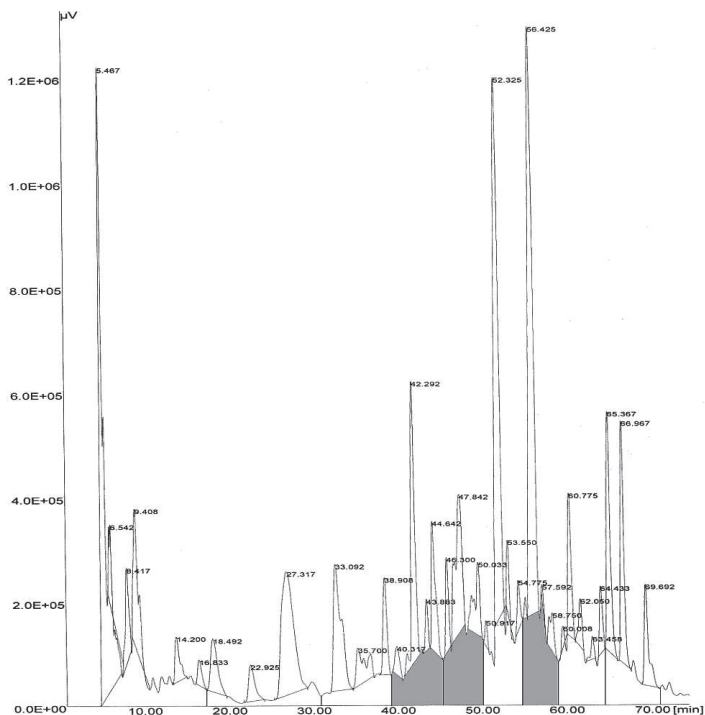
A harmadik módszer szerint a denaturálás ugyancsak guanidin-HCl jelenlétében történt, a DTT-s redukciót követő alkilezés viszont 4-vinilpiridin hozzáadásával valósult meg. A proteolitikus hidrolízis során a tripszin:AGP arány 1:25 volt [99]. A peptideket és glikopeptideket tartalmazó elegyet ultraszűrés és szilárd fázisú extrakciós tisztítás után fordított fázisú HPLC módszerrel vizsgáltam.

### **5.3.9 A tripszines emésztési termék RP-HPLC vizsgálata**

Az AGP-ből keletkező peptideket és glikopeptideket tartalmazó elegyet elsőként fordított fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam. Célom a glikopeptidok elválasztása és azonosítása volt, tekintettel a későbbiekben alkalmazni kívánt kapcsolt HPLC-MS vizsgálatra.

A kromatogramok tanúsága szerint az utóbbi, harmadik tripszines emésztési eljárás tűnt a legsikeresebbnek, mivel ezeknél a mintáknál tapasztaltam a legmagasabb számú és legnagyobb intenzitású komponensek megjelenését (19.ábra). A csúcsok glikopeptid-tartalmának vizsgálatára 18-30 perc, valamint 30-40 perc között, 40 perctől pedig 5 perces intervallumokban frakciókat szedtem.





19. ábra Gyűjtött (pool) humán szérum AGP minta tripszines emésztési termékének RP-HPLC kromatogramja

### 5.3.10 A tripszines emésztési termék oligoszacharid-tartalmának vizsgálata

A tripszines emésztéssel nyert és RP-HPLC-vel elválasztott glikopeptidek vizsgálata céljából a frakciókat PNG-áz F enzimmal hidrolizáltam és oligoszacharid-tartalmukat a mintaelőkészítési lépések után a korábbiakban ismertetett NP-HPLC módszerrel vizsgáltam. Az eredmények a 20. ábrán láthatók.



## 5.4 Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

Napjainkban széles körben elterjedt a glikoproteinek élettani célból való részletesebb tanulmányozása. Ennek fontosságát felismerve, munkám célja az volt, hogy a humán szérumban jelentős mennyiségben előforduló  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) glikánszerkezetét vizsgáljam daganatos megbetegedések esetén. Mind a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás, mind a tömegspektrometriás mérések eredményei különbséget mutattak a különböző antennáris szerkezetű oligoszacharidok mennyiségi eloszlásában.

Azon túl, hogy adatot kaptunk a humán szérum AGP poszttranszlációs módosításában bekövetkező, az oligoszacharid-szerkezetet érintő változásokról, eredményeinknek orvosi szempontból is nagy haszna van. Nagyobb számú minta esetén felállítható olyan matematikai modell, ami alapján az alanyokat a vizsgálati eredményük, vagyis oligoszacharid „ujjlenyomatuk” szerint az arra jellemző (kór)csoportha sorolhatjuk. Ez a lehetőség segítséget nyújthat a daganatos megbetegedések korai kimutatásában, a beteg állapotának és a kezelések sikerességének követésében. Szelektív vizsgálati módszereink alapját képezhetik újabb diagnosztikai eljárások alkalmazásának. Felmerül továbbá a vizsgálatok kiterjesztése más betegségek területére is.

Az AGP még részletesebb tanulmányozása szempontjából fontos lehet a glikánoknak a fehérjelánchoz való kapcsolódási pontja szerinti vizsgálata a különböző kórcsoportok esetén [108].

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkámban a humán szérum  $\alpha 1$ -savanyú glikoprotein (AGP) glikánszerkezetének, ún. mikroheterogenitásának tanulmányozását tűztem ki célul daganatos megbetegedések esetén. Vizsgálataim során arra kerestem a választ, hogy az AGP oligoszacharid szerkezetében kimutathatók-e jellegzetes változások az ovárium tumoros és limfómás egyének mintáiban az egészségesekéhez képest lehetőséget adva egy új tumormarker fejlesztésére.

Az AGP humán szérumból való előállítására olyan szelektív és biokompatibilis mintaelőkészítési módszereket alkalmaztam, amelyek a glikoprotein legkisebb mértékű degradációjával jártak együtt. Ezek a folyadék/folyadék extrakciót, alkoholos kicsapást, ioncserélő kromatográfiát, festék ligandum affinitáskromatográfiát és gélkromatográfiát foglalták magukban. A kíméletesség szempontjából fontos szerepet töltött be a fehérje etanollal történő kicsapása és festék ligandum (Cibacron Blue) affinitáskromatográfiás tisztítása. Az AGP minták tisztaságáról SDS-PAGE gélelektroforetikus módszerrel győződtem meg.

Kísérleteim során HPLC módszerrel határoztam meg az AGP oligoszacharidok szíalsavtartalmát és a vizsgált (kór)csoportok adatait összehasonlítottam. Eredményeim szerint az ovárium daganatos mintákban 20 %-kal ( $p < 0,05$ ), a limfómás minták esetén pedig 35 %-kal ( $p < 0,01$ ), szignifikánsan nagyobb mennyiségű szíalsavat találtam az egészséges egyének mintáihoz képest, ami arra utal, hogy a nagyobb szíalsavtartalmú, tehát nagyobb elágazásszámú (tri- és tetraantennáris) szerkezetek aránya megnövekedett a kóros mintákban.

Az AGP oligoszacharidok tanulmányozása céljából megvalósítottam a fehérje protein N-glikozidáz F (PNG-áz F) emésztését, melynek során a glikoproteinről lehasított glikánok frakcióját alkoholos kicsapással nyertem ki a további vizsgálatok számára. Az oligoszacharidokat gélkromatográfiás módszerrel tisztítottam.

A glikánok antranilsav-származékait normál fázisú HPLC módszerrel választottam el és azokat szíalsavtartalmuk szerint frakcionáltam. Eredményeim szerint az elágazások száma alapján elnevezett (egy, illetve két szíalsavval rendelkező) bi-, valamint tri- és tetraantennáris oligoszacharidok csoportjait

választottam el. A frakciók igazolása megfelelő mintaelőkészítés után MALDI-TOF analízissel, valamint oligoszacharid standardok injektálásával történt.

Nagyszámú egyedi AGP oligoszacharid minta NP-HPLC adatai szerint a négy szálsavat tartalmazó, tetraantennáris frakció mennyiségében mutatkozott számottevő különbség az egészséges és kóros minták között. Ez az ovárium daganatos csoportnál 35 %-os ( $p < 0,01$ ), a limfómás egyének esetén pedig 45 %-os ( $p < 0,001$ ), szignifikáns növekedést jelentett az egészséges egyének mintáihoz képest.

Nagyszámú egyedi oligoszacharid mintát állítottam elő egészséges, ovárium daganatos és limfómás egyének szérum AGP frakciójából MALDI-TOF vizsgálatok számára. A glikánokat PNG-áz F enzimmal hasítottam le, az oligoszacharidok elegyét pedig gélkromatográfiával tisztítottam. A tömegspektrometriás vizsgálat érzékenységét antrilsavval történő származékképzéssel növeltem, amelyet újabb gélkromatográfiás tisztítás követett. Az egyedi minták MALDI-TOF analízise során megfigyelhető volt, hogy a nagyobb elágazásszámú tetraantennáris és a fukózt tartalmazó molekulák aránya magasabb volt a kóros minták esetén az egészséges egyénekével összehasonlítva [S1].

Munkám során az oligoszacharidok kapcsolódási hely szerinti vizsgálat céljából elvégeztem a humán szérum AGP tripszines emésztését és a peptidek, glikopeptidek szilárd fázisú extrakcióval történő tisztítását.

A tripszines hidrolizátum komponenseit RP-HPLC módszerrel frakcionáltam. A PNG-áz F emésztést követően NP-HPLC módszerrel vizsgáltam a frakciók glikántartalmát, amely alapján beazonosítottam a glikopeptideket tartalmazó csoportokat. Az elemzés célja a peptidkeverék HPLC-MS vizsgálata kidolgozásának támogatása volt.

Az érzékeny és szelektív detektálás érdekében a tripszinnel hidrolizált AGP minták HPLC-MS módszerrel történő analizisére is sor került. A kromatogramokból a glikopeptidek csúcsai azonosíthatók voltak. Ez az eljárás kiindulópontul szolgált a glikánoknak a fehérjelánchoz való kapcsolódási helye szerinti részletesebb vizsgálatához [108].

Kísérleteim során olyan jellegzetes eltéréseket tapasztaltam a humán szérum AGP glikánszerkezetében a daganatos megbetegedések esetén, amelyek további diagnosztikai eljárások kifejlesztésének alapját képezhetik.

## 7 IRODALOMJEGYZÉK

1. Harvey DJ. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**; 18, 349.
2. Van Dijk W, Havenaar EC, Brinkman-Van der Linden ECM.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein (orosomucoid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function. *Glycoconjugate J.* **1995**; 12, 227.
3. Schmid K.  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein. *The plasma proteins*, Ed. Putnam FW. **1975**; 183.
4. Mackiewicz A, Pawlowski T, Mackiewicz-Pawlovská A, Wiktorowicz K, Mackiewicz S. Microheterogeneity forms of alpha 1-acid glycoprotein as indicators of rheumatoid arthritis activity. *Clin. Chim. Acta* **1987**; 163, 185.
5. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **1988**; 40, 1.
6. Kremmer T, Boldizsár M, Kovács J, Paulik E, Bencsik K, Szajáni B. Determination and analysis of human serum alpha-1-acid glycoprotein by liquid chromatographic methods. *J. Liquid Chromatogr.* **1995**; 18, 1207.
7. Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, Bastie JN, Degos L, Berthaud P, Marolleau JP, Calvo F, Chomienne C, Mahon FX, Rousselot P. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec®) in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **2003**; 66, 1907.
8. Hiraoka A, Tominaga I, Hori K. One-step capillary isoelectric focusing of the proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with neurological disorders. *J. Chromatogr. A* **2002**; 961, 147.
9. Havenaar EC, Dolhain RJEM, Turner GA, Goodarzi MT, van Ommen ECR, Breedveld FC, van Dijk W. Do synovial fluid acute phase proteins from patients with rheumatoid arthritis originate from serum? *Glycoconjugate J.* **1997**; 14, 457.
10. Lögdberg L, Wester L. Immunokalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**; 1482, 284.
11. Schmid K. Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**; 72, 2816.
12. Weimer HE, Mehl JW, Winzler RJ. Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J. Biol. Chem.* **1950**; 185, 561.

13. Schmid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M, Nanno S. Structure of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* **1973**; 12, 14.
14. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**; 1482, 157.
15. Montreuil J. Primary structure of glycoprotein glycans: basis for the molecular biology of glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1980**; 37, 157.
16. Wieruszewski JM, Fournet B, Konan D, Biou D, Durand G. 400-MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy of fucosylated tetrasialyl oligosaccharides isolated from normal and cirrhotic  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Febs Letters* **1988**; 238, 390.
17. Wormald MR, Petrescu AJ, Pao YL, Glithero A, Elliott T, Dwek RA. Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling. *Chem. Rev.* **2002**; 102, 371.
18. Nagy K, Vékey K, Imre T, Ludányi K, Barrow M, Derrick PJ. Electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Anal. Chem.* **2004**; 76, 4998.
19. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab. Rev.* **2001**; 33, 161.
20. Kuroda Y, Shibukawa A, Nakagawa T. The role of branching glycan of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in enantioselective binding to basic drugs as studied by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* **1999**; 268, 9.
21. Jia Z, Ramstad T, Zhong M. Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**; 30, 405.
22. Duché JC, Hervé F, Tillement JP. Study of the expression of the genetic variants of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting. *J. Chromatogr. B* **1998**; 715, 103.
23. Hervé F, Duché JC, Jaurand MC. Changes in expression and microheterogeneity of the genetic variants of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in malignant mesothelioma. *J. Chromatogr. B* **1998**; 715, 111.
24. Jolliet-Riant P, Boukef MF, Duché JC, Simon N, Tillement JP. The genetic variant A of human alpha 1-acid glycoprotein limits the blood to brain transfer of drug it binds. *Pharmacol. Letters* **1998**; 62, 219.
25. Duché JC, Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I, Barré J. Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clin. Biochem.* **2000**; 33, 197.



26. Hervé F, Millot MC, Eap CB, Duché JC, Tillement JP. Two-step chromatographic purification of human plasma  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. Its application to the purification of rare phenotype samples of the protein and their study by chromatography on immobilized metal chelate affinity adsorbent. *J. Chromatogr. B* **1996**; 678, 1.
27. Mittermüller J, Weidinger S. Genetic study of orosomucoid by isoelectric focusing and immunoprinting in patients with carcinoma. *Electrophoresis* **1992**; 13, 785.
28. Higai K, Aoki Y, Azuma Y, Matsuto K. Glycosylation of site-specific glycans of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein and alterations in acute and chronic inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**; 1725, 128.
29. Kratz E, Poland DCW, van Dijk W, Katnik-Prastowska I. Alterations of branching and differential expression of sialic acid on alpha-1-acid glycoprotein in human seminal plasma. *Clin. Chim. Acta* **2003**; 331, 87.
30. Nakagawa H, Hato M, Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, Takahata M, Iwasaki N, Minami A, Nishimura SI. Detection of altered N-glycan profiles in whole serum from rheumatoid arthritis patients. *J. Chromatogr. B* **2007**; (Article in Press)
31. Elliott MA, Elliott HG, Gallagher K, McGuire J, Field M, KD Smith. Investigation into the Concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chromatogr. B* **1997**; 688, 229.
32. Majewski W, Laciak M, Kapcinska M, Staniszewski R, Mackiewicz A. N-glycoforms of serum alpha-1-acid glycoprotein in patients with lower limb chronic arterial ischaemia. *Intl. J. Angiol.* **2003**; 12, 96.
33. Higai K, Azuma Y, Aoki Y, Matsumoto K. Altered glycosylation of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **2003**; 329, 117.
34. Orczyk-Pawilowicz M, Hirnle L, Katnik-Prastowska I. Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid alpha-1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies. *Clin. Chim. Acta* **2006**; 367, 86.
35. W. De Graaf T, Van der Stelt ME, Anbergen MG, Van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera. *J. Exp. Med.* **1993**; 177, 657.
36. Brinkman Van der Linden ECM, Van Ommen ECR, Van Dijk W. Glycosylation of alpha(1)-acid glycoprotein in septic shock: Changes in degree of branching and in expression of sialyl Lewis(x) groups. *Glycoconjugate J.* **1996**; 13, 27.

37. Poland DCW, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Koeleman CAM, Van Het Hof B, Van Dijk W. Increased  $\alpha$ 3-fucosylation of  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function. *Glycoconjugate J.* **2001**; 18, 261.
38. Rydén I, Pålsson P, Lundblad A, Skogh T. Fucosylation of  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein (orosomucoid) compared with traditional biochemical markers of inflammation in recent onset rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta* **2002**; 317, 221.
39. Olewicz-Gawlik A, Korczowska-Lacka I, Lacki JK, Klama K, Hrycaj P. Fucosylation of serum  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Clin. Rheumatol.* **2007**; (Article in Press)
40. Laurent P, Miribel L, Bienvenu J, Vallve C, Arnaud P. A three-step purification of human  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein. *Febs Letters* **1984**; 168, 79.
41. Birkenmeyer G, Kopperschläger G. Application of dye-ligand chromatography to the isolation of  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein. *J. Chromatogr.* **1982**; 235, 237.
42. Kawashima H, Murata T, Yamamoto K, Tateishi A, Irimura T, Osawa T. A simple method for the release of asparagine-linked oligosaccharides from a glycoprotein purified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* **1992**; 111, 620.
43. Küster B, Krogh TN, Mortz E, Harvey DJ. Glycosylation analysis of gel-separated proteins. *Proteomics* **2001**; 1, 350.
44. Travis J, Pannell R. Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin. Chim. Acta* **1973**; 49, 49.
45. Gianazza E, Arnaud P. Chromatography of plasma proteins on immobilized Cibacron Blue F3-GA. Mechanism of the molecular interaction. *Biochem. J.* **1982**; 203, 637.
46. Azzimonti F, Atchley DH, Morrison CA, Dodd S, Boulton DW, DeVane CL, Arnaud P. One step purification of  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein from human plasma. Fractionation of its polymorphic allele products. *J. Chromatogr. B* **2003**; 784, 33.
47. Budnik BA, Lee RS, Steen JAJ. Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**; 1764, 1870.
48. Pos O, Oostendorp RAJ, Van Der Stelt ME, Scheper RJ, Van Dijk W. Con A-nonreactive human  $\alpha$ <sub>1</sub>-acid glycoprotein (AGP) is more effective in modulation of lymphocyte proliferation than Con A-reactive AGP serum variants. *Inflammation* **1990**; 14, 133.

49. Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. Analysis of the five glycosylation sites of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Biochem. J.* **1992**; 283, 105.
50. Shiyan SD, Bovin NV. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein. *Glycoconjugate J.* **1997**; 14, 631.
51. Ogata S, Muramatsu T, Kobata A. Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-sepharose. *J. Biochem.* **1975**; 78, 687.
52. Elliott MA, Elliott HG, Gallagher K, McGuire J, Field M, Smith KD. Investigation into the Concanavalin A reactivity, fucosylation and oligosaccharide microheterogeneity of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein expressed in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *J. Chromatogr. B* **1997**; 688, 229.
53. Poland DCW, Kulik W, Van Dijk W, Hallemesch MM, Jakobs C, De Meer K. Distinct glycoforms of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein have comparable synthesis rates: a [ $^{13}\text{C}$ ]valine-labelling study in healthy humans. *Glycoconjugate J.* **2004**; 20, 99.
54. Rydén I, Skude G, Lundblad A, Pålsson P. Glycosylation of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in inflammatory disease: analysis by high-pH anion-exchange chromatography and concanavalin A crossed affinity immunoelectrophoresis. *Glycoconjugate J.* **1997**; 14, 481.
55. Sei K, Nakano M, Kinoshita M, Masuko T, Takehi K. Collection of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein molecular species by capillary electrophoresis and the analysis of their molecular masses and carbohydrate chains. Basic studies on the analysis of glycoprotein glycoforms. *J. Chromatogr. A* **2002**; 958, 273.
56. Alvarez-Manilla G, Atwood JIII, Guo Y, Warren NL, Orlando R, Pierce M. Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *J. Proteome Res.* **2006**; 5, 701.
57. Ito M, Ikeda K, Suzuki Y, Tanaka K, Saito M. An improved fluorometric high-performance liquid chromatography method for sialic acid determination: an internal standard method and its application to sialic acid analysis of human apolipoprotein E. *Anal. Biochem.* **2002**; 300, 260.
58. Traving C, Schauer R. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**; 54, 1330.
59. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1957**; 24, 604.
60. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* **1959**; 234, 1971.

61. Hara S, Takemori Y, Yamaguchi M, Nakamura M. Fluorometric high-performance liquid chromatography of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal. Biochem.* **1987**; 164, 138.
62. Hara S, Yamaguchi M, Takemori Y, Furuhashi K, Ogura H, Nakamura M. Determination of mono-o-acylated N-acetylneuraminic acids in human rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **1989**; 179, 162.
63. Kakehi K, Funakudo T, Suzuki S, Oda Y, Kitada Y. 3-Aminobenzamide and 3-aminobenzoic acid, tags for capillary electrophoresis of complex carbohydrates with laser-induced fluorescent detection. *J. Chromatogr. A* **1999**; 863, 205.
64. Guttman A. Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **1997**; 763, 271.
65. Lamari FN, Karamanos NK. Separation methods for sialic acids and critical evaluation of their biologic relevance. *J. Chromatogr. B* **2002**; 781,3.
66. Merry AH, Neville DCA, Royle L, Matthews B, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Anal. Biochem.* **2002**; 304, 91.
67. Thayer JR, Rohrer JS, Avdalovic N, Gearing RP. Improved to in-line desalting of oligosaccharides separated by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.* **1998**; 256, 207.
68. Yokota H, Mori K, Yamaguchi H, Kaniwa H, Saisho N. Monosaccharide composition analysis of paminase by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**; 21, 767.
69. Bruggink C, Maurer R, Herrmann H, Cavalli S, Hoefler F. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2005**; 1085, 104.
70. Barroso B, Dijkstra R, Geerts M, Lagerwerf F, Van Veelen P, De Ru A. On-line high-performance liquid chromatography/mass spectrometric characterization of native oligosaccharides from glycoproteins. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2002**; 16, 1320.
71. Bruggink C, Wührer M, Koeleman CAM, Barreto V, Liu Y, Pohl C, Ingendoh A, Hokke CH, Delder AM. Oligosaccharide analysis by capillary-scale high-pH anion-exchange chromatography with on-line ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2005**; 829, 136.
72. Jackson P, Williams GR. Polyacrylamide gel electrophoresis of reducing saccharides labeled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid: application to the enzymological structural analysis of oligosaccharides. *Electrophoresis* **1991**; 12, 94.

73. Yamamoto K, Hamase K, Zaitu K. 2-Amino-3-phenylpyrazine, a sensitive fluorescence prelabeling reagent for the chromatographic or electrophoretic determination of saccharides. *J. Chromatogr. A* **2003**; 1004, 99.
74. Anumula KR, Dhume ST. High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology* **1998**; 8, 685.
75. Anumula KR, Du P. Characterization of Carbohydrates Using Highly Fluorescent 2-Aminobenzoic Acid Tag Following Gel Electrophoresis of Glycoproteins. *Anal. Biochem.* **1999**; 275, 236.
76. Rudd PM, Dwek RA. Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**; 8, 488.
77. Rudd P, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of *N*-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* **2001**; 1, 285.
78. Kotani N, Takasaki S. Analysis of 2-aminobenzamid-labeled oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography with fluorometric detection. *Anal. Biochem.* **1998**; 264, 66.
79. Wuhrer M, Koeleman CAM, Hokke CH, Deelder AM. Nano-scale liquid chromatography-mass spectrometry of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides at low femtomole sensitivity. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**; 232, 51.
80. Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y. Structure analyses of oligosaccharides by tagging of the reducing end sugars with a fluorescent compound. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**; 85, 257.
81. Wang WT, LeDonne NC, Aerckerman B, Sweely CC. Structural characterization of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, fast-atom bombardment-mass spectrometry, and exoglycosidase digestion. *Anal. Biochem.* **1984**; 141, 366.
82. Jackson P. The analysis of fluorophore-labeled carbohydrates by polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Biotechnol.* **1996**; 5, 101.
83. Charlwood J, Bryant D, Skehel JM, Camilleri P. Analysis of *N*-linked oligosaccharides: progress towards the characterisation of glycoprotein-linked carbohydrates. *Biomolecular Engineering* **2001**; 18, 229.
84. Guttman A, Chen FT, Evangelista RA, Cooke N. High-resolution capillary gel electrophoresis of reducing oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate. *Anal. Biochem.* **1996**; 233, 234.

85. Huang L, Riggin RM. Analysis of nonderivatized neutral and sialylated oligosaccharides by electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**; 72, 3539.
86. Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T. Simultaneous microanalysis of *N*-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2002**; 968, 89.
87. Zhao J, Qiu W, Simeone DM, Lubman DM. *N*-linked glycosylation profiling of pancreatic cancer serum using capillary liquid phase separation coupled with mass spectrometric analysis. *J. Proteome Res.* **2007**; 6, 1126.
88. Harvey DJ. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. *Proteomics* **2001**; 1, 311.
89. Stahl B, Steup M, Karas M, Hillenkamp F. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1991**; 63, 1463.
90. Papac DI, Wong A, Jones AJS. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1996**; 68, 3215.
91. Beavis RC, Chait BT. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**; 3, 432.
92. Lattova E, Perreault H. Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2003**; 793, 167.
93. Pitt JJ, Gorman JJ. Oligosaccharide characterization and quantitation using 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **1997**; 248, 63.
94. Charlwood J, Skehel JM, Camilleri P. Analysis of *N*-linked oligosaccharides released from glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **2000**; 284, 49.
95. Sato Y, Suzuki M, Nirasawa T, Suzuki A, Endo T. Microsequencing of glycans using 2-aminobenzamide and MALDI-TOF mass spectrometry: Occurrence of unique linkage-dependent fragmentation. *Anal. Chem.* **2000**; 72, 1207.
96. Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh MM, Dobrolecki LE, Hickey RJ, Vinson J, Sweeney CJ, Novotny MV. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J. Proteome Res.* **2007**; 6, 1822.
97. Costello CE. Time, life ... and mass spectrometry. New techniques to address biological questions. *Biophys. Chem.* **1997**; 68, 173.

98. Morelle W, Faid V, Michalski JC. Structural analysis of permethylated oligosaccharides using electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and deuterio-reduction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**; 18, 2451.
99. Dage JL, Ackermann BL, Halsall HB. Site localization of sialyl Lewis<sup>X</sup> antigen on  $\alpha$ 1-acid glycoprotein by high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Glycobiology* **1998**; 8, 755.
100. Mills K, Johnson AW, Dietrich O, Clayton PT, Winchester BG. A strategy for the identification of site-specific glycosylation in glycoproteins using MALDI TOF MS. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**; 11, 75.
101. Stubbs HJ, Shia MA, Rice KG. Preparative purification of tetraantennary oligosaccharides from human asialyl orosomucoid. *Anal. Biochem.* **1997**; 247, 357.
102. Wuhrer M, Catalina MI, Deelder AM, Hokke CH. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J. Chromatogr. B* **2007**; 849, 115.
103. Wuhrer M, Deelder AM, Hokke CH. Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2005**; 825, 124.
104. Sutton CW, O'Neill JA, Cottrell JS. Site-specific characterization of glycoprotein carbohydrates by exoglycosidase digestion and laser desorption mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **1994**; 218, 34.
105. Juhasz P, Martin SA. The utility of nonspecific proteases in the characterization of glycoproteins by high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1997**; 169, 217.
106. Sullivan B, Addona TA, Carr SA. Selective detection of glycopeptides on ion trap mass spectrometers. *Anal. Chem.* **2004**; 76, 3112.
107. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; 227, 680.
108. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnár-Szöllösi É, Kremmer T, Malorni A, Vékey K. Glycosylation site analysis of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**; 40, 1472.
109. Azzimonti F, Atchley DH, Morrison CA, Dodd S, Boulton DW, DeVane CL, Arnaud P. One step purification of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein from human plasma. Fractionation of its polymorphic allele products. *J. Chromatogr. B* **2003**; 784, 33.
110. Sagi D, Peter-Katalinic J, Conradt HS, Nimtz M. Sequencing of tri- and tetraantennary N-glycans containing sialic acid by negative mode ESI QTOF tandem MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**; 13, 1138.

111. Ritchie MA, Gill AC, Deery MJ, Lilley K. Precursor ion scanning for detection and structural characterization of heterogeneous glycopeptide mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**; 13, 1065.
112. Rudd PM, Colominas C, Royle L, Murphy N, Hart E, Merry AH, Hebestreit HF, Dwek RA. A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of *N*-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics* **2001**; 1, 285.
113. Bekiroglu S, Kenne L, Sandström C. NMR study on the hydroxy protons of the Lewis X and Lewis Y oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **2004**; 339, 2465.
114. Schmid K. Human plasma  $\alpha_1$ -acid glycoprotein — biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and ploymorphisms. *Alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein: Genetics, Biochemistry, Physiological Functions, and Pharmacology*, Ed. Riss AR, **1989**; 7.
115. Jackson RL, Segrest JP, Kahane I, Marchesi VT. Studies on the major sialoglycoprotein of the human red cell membrane. Isolation and characterization of tryptic glycopeptides. *Biochem.* **1973**; 12, 3131.



## KÖZLEMÉNYEK

### Az értekezés alapját képező saját közlemények

- S1. Kremmer T, Szöllősi É, Boldizsár M, Vincze B, Ludányi K, Imre T, Schlosser G, Vékey K. Liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of human serum acid alpha-1-glycoprotein. *Biomed. Chrom.* **2004**; 18, 323-329.
- S2. Szöllősi É, Kremmer T, Ludányi K, Imre T, Schlosser G, Boldizsár M, Vincze B, Vékey K. A novel method for the separation and purification of human serum acid alfa-1-glycoprotein. Liquid chromatographic and mass spectrometric investigation of tryptic fragments. *Chromatographia* **2004**; Suppl. 60, 213-219.

### A dolgozat témájában megjelent további publikáció

Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Molnár-Szöllősi É, Kremmer T, Malorni A, Vékey K. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2005**; 40, 1472-1483.

### A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikáció

Gazdag M, Takács T, Szöllősi É. Capillary electrochromatography for chiral separation and purity testing of pharmaceutical drug substances. *Acta Pharm. Hung.* **2003**; 73(1), 23-28.

### Az értekezéshez kapcsolódó előadások

1. T. Imre, K. Héberger, L. Drahos, T. Kremmer, É. Szöllősi, G. Pocsfalvi, K. Vékey: Mass spectrometric and statistical analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein from cancer patients and healthy individuals. *Conferentia Chemometrica 2007*, Budapest, September 2-5, **2007**.

2. É. Molnár-Szöllősi, T. Imre, T. Kremmer, B. Vincze, K. Vékey, A. Rosta, T. Pulay, T. Schneider: Functional proteomics of human serum alpha-1- acid glycoprotein. *19<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR 2006)*, Budapest, Hungary, 1-4. July, **2006**.
  
3. Molnár-Szöllősi Éva, Imre Tímea, Pulay Tamás, Rosta András, Schneider Tamás, Vékey Károly, Kremmer Tibor: A humán szérum savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein oligoszacharid szerkezetének vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *Magyar Onkológusok Társaságának XXVI. Kongresszusa*, Budapest, **2005**. November 3-5.
  
4. Molnár-Szöllősi Éva, Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Vékey Károly, Kremmer Tibor: Humán szérum savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein szerkezeti mikroheterogenitásának vizsgálata, *MKE „Vegyészkonferencia 2005” Hajdúszoboszló*, **2005**. Június 28-30.
  
5. Imre T., Ludányi K., Molnárné Szöllősi É., Kremmer T., Pócsfalvi G., Malorni A., Vékey K.: Humán szérum alfa-1-savas glikoprotein (AGP) glikozilációs pozícióinak felderítése RP capLC-Qtof MS technikával, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Hévíz*, **2004**. szeptember 22-24.
  
6. Molnár-Szöllősi É., Imre T., Ludányi K., Kremmer T., Vékey K.: Humán szérum savanyú  $\alpha$ 1-glikoprotein oligoszacharid-tartalmának elválasztása és vizsgálata daganatos megbetegedésekben, *METT Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Hévíz*, **2004**. szeptember 22-24.
  
7. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllősi Éva, Vékey Károly: A humán szérum alfa-1-savas glikoprotein oligoszacharidjainak MALDI-MS vizsgálata, *Analitikai Vegyészkonferencia*, Balatonföldvár, **2004**. június 30. – július 2.

8. Tímea Imre, Krisztina Ludányi, Tibor Kremmer, Éva Szöllösi, Károly Vékey: MALDI-TOF MS investigation of the oligosaccharide content of human serum alpha-1-acid-glycoprotein, *22<sup>nd</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry*; Tokaj, Hungary, 2-6 May, **2004**.
  
9. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Kremmer Tibor, Molnárné Szöllösi Éva, Vékey Károly: Humán szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata, „Tömeg és molekula spektroszkópia alkalmazási lehetőségei az orvosi diagnosztikában” *Szakmai Szeminárium*, MTA Kémiai Kutatóközpont, **2004**. április 14.
  
10. Kremmer Tibor, Vincze Borbála, Vékey Károly, Molnárné Szöllösi Éva, Ludányi Krisztina, Édesné Boldizsár Mariann, Imre Tímea, Mező Gábor, Csuka Orsolya, Gaál Dezső: Target specifikus peptidok és antimetabolit enziminhibitor konjugátumok előállítás és daganatellenes hatásának vizsgálata. Humán szérum savanyú alfa-1-glikoprotein (AGP) szerkezetének és marker jellegének vizsgálata. *III. Medichem Konferencia*, MTA Kémiai Kutatóközpont, Budapest, **2004**. március 19.
  
11. T. Kremmer, M. É. Szöllösi, B. Vincze, M. Boldizsár, K. Ludányi, K. Vékey, T. Imre, G. Schlosser: RP-HPLC and Mass Spectrometry of Tryptic Fragments Derived from Human Serum AGP. *5<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*, Siófok, **2003**. szeptember 3-5.
  
12. Tímea Imre, Krisztina Ludányi, Gitta Schlosser, Tibor Kremmer, Éva Szöllösi, Károly Vékey: Investigation of oligosaccharides of human serum alpha-1-acid-glycoprotein by MALDI-TOF MS, *21<sup>st</sup> Informal Meeting on Mass Spectrometry*, Antwerp, 11-15 May, **2003**.
  
13. Imre Tímea, Ludányi Krisztina, Schlosser Gitta, Kremmer Tibor, Szöllösi Éva, Vékey Károly: Human szérum AGP tömegspektrometriás vizsgálata. *MTA Peptidkémiai Munkabizottság és Nukleotidkémiai Munkabizottsági együttes tudományos ülése* **2003**. május 26-28., Balatonszemes

14. Molnárné Szöllősi É., Ludányi K., Vékey K., Farkas R., Édesné Boldizsár M., Vincze B., Kremmer T.: Folyadék-kromatográfiás módszerek alkalmazása a mono- és oligoszacharidok analízisében, *METT Elvlasztástudományi Vándorgyűlés, Lillafüred*, **2002**. Okt. 16-18.
15. Szöllősi Éva, Kremmer Tibor, Dibó Gábor: A kapilláris izoelektromos fókuszálás alkalmazása glikoproteinek jellemzésére, *MTA Peptidkémiai Munkabizottsági Ülés, Balatonszemes*, **2001**. május 22.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, dr. Dibó Gábornak, hogy nála végezhettem doktori munkámat és hasznos tanácsaival támogatott disszertációm elkészítésében. Hálás vagyok Prof. Dr. Kremmer Tibornak, aki mellett sokat tanultam a bioanalitikai alkalmazásokról és tapasztalatait megosztotta velem a kísérleti munka során. Köszönetet szeretnék mondani Édesné Boldizsár Mariannak, hogy bevezetett a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia rejtelmeibe és jókedvével színesítette dolgozóm hétköznapijainkat, valamint dr. Vincze Borbálának, hogy támogatott dolgozatom elkészítésében. Továbbá köszönetet szeretnék mondani az Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztálya asszisztenseinek, Nagy Istvánné Beának, Ary Zsuzsinak, Susztrik Beatrixnek és Vukovics Andrásné Ritának, hogy segítséget nyújtottak az AGP minták előállításában és nem utolsósorban Kovács Margitnak, akihez a szervezési kérdésekben fordulhattam. Köszönöm a Biokémiai Osztály kollektívájának, hogy támogató, vidám légkörben végezhettem munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani együttműködő partnereinknek, az MTA Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometria Osztály vezetőjének, Dr. Vékey Károlynak, hogy szakértelmével támogatta a tömegspektrometriás vizsgálatokat, valamint Imre Tímeának, dr. Ludányi Krisztinának, dr. Schlosser Gittának és dr. Szabó Pálnak a tömegspektrometriás elemzések elvégzéséért, valamint szakmai támogatásukért.

Köszönettel tartozom dr. Magyar Gabriellának a statisztikai számításokban nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Kapás Margitnak, a Richter Gedeon Nyrt. Gyógyszerkinetikai Kutatólaboratórium osztályvezetőjének és Dr. Tihanyi Károly főosztályvezetőnek, hogy támogattak disszertációm elkészítésében.

Végül szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy támogattak a doktori munkám során. Köztük is sokat köszönhetek férjemnek, Molnár Márknak, aki mindvégig mellettem állt és segítségemre volt.

## RÖVID ÖSSZEFOGLALÓ

Napjainkban igen fontos kutatási terület a glikoproteinek szénhidrát-szerkezetének, mikroheterogenitásának vizsgálata, amely során a biomolekulákban megfigyelhető szerkezeti jellegzetességek és a biológiai funkció közötti összefüggésekre próbálnak fényt deríteni. Doktori munkám során célom a humán szérum  $\alpha$ 1-savanyú glikoprotein (AGP) glikánszerkezetének tanulmányozása és ezáltal egy új potenciális tumormarker felkutatása volt daganatos megbetegedések esetén.

Az AGP egészséges, ovárium daganatos és limfómás egyének szérumából való előállítására többlépéses, biokompatibilis mintaelőkészítési módszert alkalmaztam, amely során az analitikai és szerkezetvizsgálati módszerek számára felhasználható, nagytisztaságú mintákat állítottam elő.

Kísérleteim során az AGP minták savas hidrolízise, valamint enzimátikus emésztése után HPLC vizsgálatokkal határoztam meg szíalsavtartalmukat és az oligoszacharidoknak ezen tartalom szerinti arányát. Eredményeim alapján az AGP szíalsavtartalma és tetraantennáris oligoszacharid összetevőinek aránya szignifikáns nagyobb volt a daganatos megbetegedésben szenvedők esetén, az egészséges önkéntesekhez képest.

Nagyszámú egyedi AGP oligoszacharid minta antranilsav származékát állítottam elő és tisztítottam meg a tömegspektrometriás vizsgálatok számára. A MALDI-TOF analízis eredményei szerint a tetraantennáris, valamint a fukóz-tartalmú glikánok aránya magasabb volt a kóros minták esetén.

A humán szérum AGP tripszines emésztési termékének vizsgálata fordított fázisú HPLC módszerrel történt. A frakciókban a glikopeptidek kimutatása oligoszacharid-tartalmuk alapján, normál fázisú HPLC módszerrel történt. A kísérletek segítséget nyújtottak az AGP oligoszacharidoknak a peptidlánchoz való kapcsolódási helye szerinti HPLC-MS vizsgálatában.

Vizsgálataim során a daganatos megbetegedések esetén olyan eltéréseket tapasztaltam az egészségestől a humán szérum AGP glikánszerkezetében, amelyek további diagnosztikus eljárások kifejlesztésének alapját képezhetik.

## SUMMARY

Investigation of carbohydrate structures, namely microheterogeneity in glycoproteins is an important field of current research, where relationship between molecular structure and biological function is studied. My study focused on characterizing the antennary glycan structures of human serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) to identify a potential tumour marker in patients with cancer.

Biocompatible sample preparation methods were developed for the separation of AGP from human serum of healthy subjects and with ovary tumour or lymphoma, resulting in high purity samples suitable for analytical methods and structure exploratory techniques.

After acidic and enzymatic hydrolysis of AGP samples, HPLC measurements were used to determine their sialic acid content and the ratio of antennary oligosaccharides. According to my results sialic acid content and the proportion of tetraantennary oligosaccharides of AGP was significantly higher in samples from diseased subjects compared to healthy individuals.

High number of anthranilic derivatives of oligosaccharides from individual AGP samples were prepared and purified for mass spectrometric analysis. According to the MALDI-TOF results increases in both tetraantennary and fucose-containing structures were observed in case of diseased samples.

Tryptic hydrolysates of human serum AGP were examined using reversed phase HPLC analysis, while glycopeptide fractions were identified using normal phase HPLC oligosaccharide analysis. This aimed at glycosylation site analysis of AGP.

In conclusion, qualitative and quantitative differences in the oligosaccharide structure of human serum AGP between healthy and diseased subjects were observed. These results offer the possibility of diagnostic application of these differences.

